

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 11 月 1 日 (01.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/81371 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 7/08, 14/47, 19/00, C12N 15/00, A61K 38/10, 39/00, A61P 35/00, 35/04
- (74) 代理人: 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/03443
- (22) 国際出願日: 2001 年 4 月 23 日 (23.04.2001)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-124259 2000 年 4 月 25 日 (25.04.2000) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2-9 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石川 大 (ISHIKAWA, Dai) [JP/JP]; 〒770-0002 徳島県徳島市春日3-1-7-102 Tokushima (JP). 荻野晃一 (OGINO, Koichi) [JP/JP]; 〒772-0003 徳島県鳴門市撫養町南浜字東浜197-3 Tokushima (JP). 瀧 孝雄 (TAKI, Takao) [JP/JP]; 〒771-0205 徳島県板野郡北島町江尻字山王宮8-4 Tokushima (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GD3-MIMETIC PEPTIDES

(54) 発明の名称: GD3模倣ペプチド

(57) Abstract: GD3-Mimetic peptides which contain an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:1 to 4 or an amino acid sequence derived therefrom by substitution, deletion, addition or insertion of one or more amino acid residues and are capable of binding specifically to anti-GD3 antibody; and medicinal compositions containing the same.

(57) 要約:

配列番号: 1 から 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加もしくは挿入により改変されたアミノ酸配列を含むペプチドであって、抗GD3抗体に特異的な結合性を有するペプチドからなるGD3模倣ペプチド; 及びこれを含む有する医薬組成物。

WO 01/81371 A1

## 明 細 書

## GD 3 模倣ペプチド

## 技術分野

本発明は、GD 3 を模倣するペプチド、より詳しくはメラノーマ等の腫瘍に発現する腫瘍関連抗原の一つとして知られているGD 3 を構造的に模倣していると考えられる新しいペプチドに関する。

## 背景技術

GD 3 は、シアル酸含有スフィンゴ糖脂質に属しており、Gがシアル酸含有スフィンゴ糖脂質（ガングリオシド）の一つを、Dがジシアロ型を意味する。また、GD 3 は、GM 2、GM 3、GD 2、GT 3等の腫瘍関連抗原と同様に、ヒト・メラノーマ等の腫瘍細胞上に発現するものとして知られている。該GD 3 は、構造式上、 $\text{NeuAc } \alpha 2-8 \text{ NeuAc } \alpha 2-3 \text{ Gal } \beta 1-4 \text{ Glc1-1 Cer}$  として示される。

従来より、腫瘍の進展とGD 3 の発現が相関すること、GD 3 がメラノーマ細胞上に高発現すること、マウス抗GD 3 モノクローナル抗体の投与がメラノーマ患者の腫瘍の成長を抑制すること等が報告されている。これらのことから、GD 3 は、この種の腫瘍の免疫療法の主な標的となっている。

即ち、GD 3 に対するヒトの免疫応答が病気の臨床経過において有益な効果を及ぼすことが期待でき、これまでもワクチン分野で種々の臨床的試験が実施されてきている。しかしながら、上記期待に添う成功例は報告されていない（Cheresh, D.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 81, 5767-5771 (1984); Herlyn, M., et al., Cancer Res., 45, 5670-5676 (1985); Houghton, A. N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 82, 1242-1246 (1985); Livingston, P.O., Immunological Rev., 145, 147-163 (1995); Livingston, P.O., et al., Cancer Immunol. Immunother., 45, 1-9 (1997) 等参照）。

腫瘍に関連したガングリオシド類は、癌に対する免疫攻撃の好ましい標的として知られているが、これらは免疫原性に乏しいと言われている。

この欠点を改善するものとして、ガングリオシドに対する抗体免疫応答を発現または増大させるための癌ワクチン組成物が開示されている（特開平8-53366号）。このものは、ガングリオシドをN-グリコシル化したもの（N-グリコリルGM3）である。

また同様に、ガングリオシドを9-O-アセチル化したもの（9-O-アセチルGD3）も報告されている（米国特許第5102663号）。

更に、同様の癌ワクチンとして、GD3複合体ワクチン（GD3-キーホールリンペットヘモシアミン複合体）が、顕著に改善された抗体応答を示すことも報告されている（特表平8-508978号）。当該報告では、GD3のセラミド骨格中の二重結合をオゾン開裂することによって化学修飾し、アルデヒド基を導入後、該アルデヒド基を還元的アミノ化によってタンパク質のアミノリシル基に結合させることにより、マラリアT細胞エпитープの繰り返し、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）の外膜タンパク（OMP）、陽イオン化ウシ血清アルブミン（cBSA）、キーホールリンペットヘモシアミン（KLH）およびポリリシンを表わす合成多重抗原性ペプチドとの複合体が構築されている。また、免疫学的アジュバントとして、南米の木、キラジャサポナリアモリナ（*Quillaja saponaria* Molina）の皮から抽出された糖鎖であるQS-21（Aquila Pharmaceuticals, Worcester, MA, U.S.A.: Kensil, C. R. et al., *J. Immunol.*, 146, 431 (1991)）が最も効果的であるとしている。

このように、GD3をそのまま抗原とした従来のワクチンは、免疫応答が弱く、一過性である欠点があり、更に、原料のGD3の入手自体にかなりの困難性を伴う不利がある。即ち、一般に、生体から対象物質とするガングリオシドを多量に調製することは非常に困難である。同様に、化学合成法あるいは遺伝子工学的手法を利用したガングリオシドの合成も極めて困難である。

また、GD 3 を種々修飾してワクチンとする場合、即ち、抗原性を高めるための化学処理や複合体の作成においては、同様に、抗原および複合体の材料の入手、調製、合成工程等の煩雑さや、免疫アジュバンドの選択等も必要であるという不利がある。

一方、近年、分子生物学的手法が複合糖質の分野にも応用され、糖鎖構造をペプチドに置き換える技術が開発されつつある。本発明者らも、先にガングリオシドの一つであるGD 1  $\alpha$  に対する抗体と特異的に結合するペプチドを、糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いたバイオパニングによりファージディスプレイランダムライブラリーから得ることに成功している。

このペプチド (15mer) は、複合糖脂質の糖鎖構造を模倣するものであり (レプリカペプチド)、糖脂質GD 1  $\alpha$  に対するモノクローナル抗体と特異的に結合し、抗原であるGD 1  $\alpha$  に対する抗体の結合を阻害する活性を有していた。

また、本発明者らは、このペプチドを化学合成法により製造し、そのGD 1  $\alpha$  に対するモノクローナル抗体との反応性を確認すると共に、高転移性の癌細胞株に対して、GD 1  $\alpha$  のレプリカペプチド (化学合成品) が該癌細胞の接着性を阻害することおよび該レプリカペプチドが癌細胞の転移を抑制することも確認した (特開平10-237099号公報)。

更に、本発明者らは、ランダムペプチドライブラリーから、スフィンゴ糖脂質のラクトテトラオシルセラミドまたはラクトネオテトラシルセラミドに対する抗体と特異的に反応し、グリコシダーゼ活性を有するペプチドを得ることに成功している (特開平10-237098号公報：石川大、瀧孝雄、細胞工学, 16 (12) 1821-1828 (1997) 参照)。

最近、本発明者らの上記研究成果と同様に、ファージディスプレイペプチドライブラリーから、GD 2 / GD 3 抗原に対する抗体を用いて得られる、Trp - Arg - Tyr 配列を含む15 ~ 16mer ペプチドが、抗体と交差反応を示す旨の報告がなされている (Qiu, J., et al., Hybridoma, 18(1) 103-112

(1999))。

更に、15merおよび8merのペプチドをディスプレイする2つのファージディスプレイペプチドライブラリーから、抗GD3モノクローナル抗体MB3.6、MG22およびMG21に結合する4つのファージディスプレイペプチドが報告されている(Willers, J., et al., Peptides, 20, 1021-1026 (1999))。これらペプチドは、選択に使用された抗GD3抗体への結合性を示し、当該結合性はGD3により抑制された旨報告されているが、いずれのペプチドについても所望される免疫原性は認められなかったことが示されている。

本発明の目的は、ガングリオシドGD3の糖鎖を構造的に模倣するペプチドであって、抗GD3抗体に高い親和性を有する新規なペプチドを提供することにある。

また本発明の他の目的は、GD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチド、即ち当該ペプチドからなる免疫原で免疫して得られる抗体がGD3と交差反応性を示すことで特徴付けられ、従って、GD3に代わるワクチンとしての有用性を有する上記ペプチドを提供することにある。

更に本発明の他の目的は、上記ペプチドをコードするDNA配列、該配列を挿入した組換え体発現ベクター、該ベクターを組み込んだ宿主細胞および該細胞により産生される組換え体発現産物を提供することにある。

更に本発明の他の目的は、上記ペプチドまたは組換え体発現ベクターを有効成分とする医薬組成物を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは、さらなる研究の結果、抗GD3抗体に対する高い親和性を有する新規なアミノ酸配列を見出し、かかるアミノ酸配列を含むペプチドからなるGD3模倣ペプチドで免疫した抗血清がGD3と交差反応性を示し、従って、これらGD3模倣ペプチドがGD3に代わるワクチンとして利用できるとの知見を

得、ここに本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、配列番号：1から4のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加もしくは挿入により改変されたアミノ酸配列を含むペプチドであって、抗GD3抗体に特異的な結合性を有するペプチドからなるGD3模倣ペプチドが提供される。

特に、本発明によれば、免疫原性を高めるキャリア蛋白との融合ペプチド形態である上記GD3模倣ペプチドおよび当該キャリア蛋白がキーホールリンペットヘモシアニンである当該GD3模倣ペプチド；少なくとも1種のGD3模倣ペプチドを含む多抗原性ペプチド形態である上記GD3模倣ペプチド；GD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドである上記GD3模倣ペプチド；および配列番号：1から4のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する上記GD3模倣ペプチドが提供される。

また、本発明によれば、上記GD3模倣ペプチドを有効成分として含有する医薬組成物が提供される。

更に、本発明は、例えば以下の各態様の発明をも包含するものである。

- ①前記本発明のGD3模倣ペプチドをコードするDNA配列、特に配列番号：1から4のいずれかに示されるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：3または4に示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列；
- ②配列番号：5から8のいずれかに示される配列を有する上記DNA配列；
- ③これらDNA配列の少なくとも1種が挿入された組換え体発現ベクター；
- ④上記組換え体発現ベクターを組込んだ宿主細胞；
- ⑤上記組換え体発現ベクターを有効成分として含有する医薬組成物；
- ⑥本発明にかかる医薬組成物の、GD3を認識する抗体の誘起を刺激するかまたは該抗体の産生を増強するためのワクチンとしての使用；
- ⑦本発明にかかる医薬組成物の、抗腫瘍、抗癌または癌転移抑制のための医薬

としての使用；

⑧GD3発現性の腫瘍または癌、特に、黒色腫、大腸癌、卵巣癌、肝癌、乳癌、脳腫瘍、腎癌、膵臓癌、子宮頸癌、食道癌、肺癌および胃癌からなる群から選ばれる疾患の処置である上記医薬としての使用；

⑨リポソーム製剤である本発明の医薬組成物。

尚、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（特許庁編）および当該分野における慣用記号に従うものとする。

#### 図面の簡単な説明

図1は実施例2に示す方法により求められた本発明免疫原性ペプチドと抗GD3抗体との結合親和性を示すグラフである。図2は、実施例5で使用した多抗原性ペプチドの配列を示す図である。図3は、GD3模倣ペプチドに対する抗GD3モノクローナル抗体の結合親和性を示す図である。図4は、GD3と4F6との結合に対する固相化GD3模倣ペプチドによる結合阻害を示す図である。図5は、GD3と4F6との結合に対する外因性に添加したGD3模倣ペプチドによる結合阻害を示す図である。図6は、GD3と4F6との結合に対する外因性に添加したGD3模倣ペプチド（9残基）による結合阻害を示す図である。図7は、ペプチドR4で免疫したマウスの血清の希釈倍率とGD3のELISA結果との関係を示す図である。図8は、R4MAPで2ヶ月免疫したマウスの血清の希釈倍率とGD3のELISA結果との関係を示す図である。図9は、MAPR4で2ヶ月免疫したマウスの血清の希釈倍率とR4MAPペプチドのELISA結果との関係を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明のGD3模倣ペプチドにつき詳述する。

本発明のGD3模倣ペプチドは、配列番号：1から4のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加もしくは挿入により改変されたアミノ酸配列を含むペプチドからなり、GD3に対する抗体（抗GD3抗体）に特異的な結合性を有することにより特徴付けられる。

ここで抗GD3抗体は、当該分野における通常用語として使用され、GD3を認識する（GD3と結合する）特異抗体として定義される。当該抗体は、好ましくは、関連する他のガングリオシドとは交差性を示さず、特にはモノクローナル抗体である。

配列番号：1から4のいずれかに示されるアミノ酸配列は、GD3の糖鎖構造を模倣する特徴的なアミノ酸配列として特徴付けられ、而して、当該アミノ酸配列を含むペプチドは、抗GD3抗体に特異的な結合性を有し、本発明のGD3模倣ペプチドの好適な具体例である。

また上記特定のアミノ酸配列は、GD3の糖鎖構造を模倣するその構造的特徴が保持あるいは提示される限りにおいて、その一部アミノ酸またはアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列であることができる。

ここで、アミノ酸配列の改変、即ち「置換、欠失、付加もしくは挿入」の程度およびそれらの位置等は、改変されたアミノ酸配列が、配列番号：1から4で示されるアミノ酸配列と同様の性質を有する同効物であれば、即ち、GD3の糖鎖構造を模倣するその構造的特徴が保持あるいは提示される限りにおいて、特に制限はない。

当該改変の程度は通常80%以上の相同性、好ましくは90%以上の相同性を保持するものであればよい。

尚、本発明ペプチド中、少なくとも2つのシステイン残基を有するペプチド、例えば配列番号：2で示されるアミノ酸配列を有するペプチドは、自発的に環状



化すると考えられる。このような環状ペプチドは、線状形態で存在する場合においても活性（抗GD3抗体との特異的な結合性）を有するので、該ペプチド内のひとつまたは両方のシステイン残基およびこれら2つのシスチン残基に挟まれたアミノ酸配列部分は、GD3の糖鎖構造を模倣する構造的特徴に著しい影響を与えることなく欠失させることができる。かかる現象は、例えばコイビーネンらの報告（Koivunen, et al., J. Biol. Chem., 268, 20205-20210 (1993)）に支持される。

上記欠失されたアミノ酸配列の具体例は、例えば、GD3R2のN末端から9アミノ酸残基（PHFDSL LYP）からなる配列である。

本発明のGD3模倣ペプチドは、これら本発明にかかる上記特定のアミノ酸配列を含むペプチドからなり、而して、GD3の糖鎖構造を模倣するその構造的特徴が保持あるいは提示されており抗GD3抗体に特異的な結合性を有することにより特徴付けられる。

上記において当該特定アミノ酸配列を含むペプチドは、その抗原性等を考慮すると、少なくとも5アミノ酸配列の長さ、好ましくは8から60アミノ酸配列の長さ、より好ましくは8から30アミノ酸配列の長さあるいは10から20アミノ酸配列の長さからなることができる。

本発明のGD3模倣ペプチドは、好ましくは配列番号：3または4、特に好ましくは配列番号：4に示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加もしくは挿入により改変されたアミノ酸配列を含むペプチドからなる。

また、本発明のGD3模倣ペプチドは、より好ましくは、GD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドであり、これは、当該ペプチドがGD3に特異的な抗体を誘起できることにより特徴付けられる。

例えば、配列番号：1～4に示されるアミノ酸配列を有するペプチドとして特定される本発明のGD3模倣ペプチドは、それ自体、GD3に特異的な抗体の産

生能を有し、本発明免疫原性ペプチドの好適な具体例である。

また、該免疫原性ペプチドは、免疫原性を高めた形態とされた場合に所望の免疫原性を有するペプチドおよび当該形態であるペプチドを包含する。

而して、本発明において好ましい態様であるGD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドは、ペプチドそれ自体および免疫原性を高めた形態、例えば、免疫原性を高める慣用のキャリア蛋白との融合ペプチド形態や多抗原性ペプチド形態である本発明GD3模倣ペプチドを包含する。

尚、本発明のGD3模倣ペプチドにおいて、これがGD3の糖鎖構造を模倣する構造的特徴を保持あるいは提示していること、従って、抗GD3抗体に特異的な結合性を有することの確認は、抗GD3抗体との反応性を常法に従い試験することにより行い得る。また、本発明のGD3模倣ペプチドにおいて、これがGD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドであることの確認は、誘起された抗体がGD3と交差反応性を示すことを常法に従い試験することにより行い得る。

本発明のGD3模倣ペプチドの抗GD3モノクローナル抗体への結合特異性の検出および免疫原性ペプチドで誘起された抗体とGD3との反応性は、一具体例として後記実施例に示されている。

また、本発明のGD3模倣ペプチドは以下の態様を包含する。

- (a) 前記特定のアミノ酸配列の少なくとも1種が複数個融合または連結された配列を含むペプチドからなるGD3模倣ペプチド；
- (b) 前記特定のアミノ酸配列の少なくとも1種を含むペプチドからなる多抗原性ペプチド形態であるGD3模倣ペプチド；
- (c) 免疫原性を高める乃至は免疫応答を促進し得るキャリア蛋白乃至はペプチドとの融合ペプチド形態であるGD3模倣ペプチド。

これら本発明のGD3模倣ペプチドの具体例につき以下更に詳述する。

後述の実施例における、GD3R-1、GD3R-2、GD3R-3または

GD 3 R-4 と呼称するペプチドは、配列番号：1～4のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドとして特定される、本発明GD 3 模倣ペプチドの好適な具体例である。また、配列番号1～4のいずれかに示されるアミノ酸配列の任意の連続した9～14アミノ酸残基からなるペプチドもまた好ましい。このうち、配列番号1～4のいずれかに示されるアミノ酸配列のN末端側9～14アミノ酸残基又はC末端側9～14アミノ酸残基からなるペプチドがより好ましい。特に配列番号1～4に示されるアミノ酸配列のN末端側9アミノ酸残基又はC末端側9アミノ酸残基からなるペプチドが好ましい。当該ペプチドは、同実施例に示されるように、ファージディスプレイライブラリーを利用して抗GD 3 抗体に特異的な結合性を有するペプチドを選択することにより取得された。

本発明のGD 3 模倣ペプチドを得るに際して、当該スクリーニング手法を繰り返し採用する必要はないが、これは所望により、例えば以下のようにして実施することができる。

大集団の分子（ライブラリー）を作成し、該分子ライブラリーをスクリーニングすることにより所望ペプチドを同定する。該スクリーニングには、例えばファージディスプレイライブラリーを用いることができ、その作成方法およびスクリーニング法については、例えばスコットおよびスミスらの方法が参照できる（Scott, J. M. and Smith, G. P., Science, 249, 386-390 (1990); Smith, G. P. and Scott, J. K., Methods in Enzymology, 217, 228-257 (1993)）。また、本発明GD 3 模倣ペプチドの同定のためのより好ましい方法としては、例えば特開平10-237099号公報、特開平10-237098号公報および石川大、瀧孝雄、細胞工学, 16 (12) 1821-1828 (1997)等に記載の、糖脂質糖鎖模倣ペプチドを同定する方法を例示できる。

所望ペプチドを提示するファージクローンのスクリーニング・選択は、GD 3 を認識する抗体、好ましくはGD 3 への特異性に優れるモノクローナル抗体を利用し、当該抗体への結合性を試験することにより行い得る。

選択されたファージクローンのDNAの配列を決定することにより、所望のGD3模倣ペプチドを同定することができる。DNAの配列決定は、当業界で公知の方法により容易に行い得る。例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463-5467 (1977)〕やマキシムーギルバート法〔Method in Enzymology, 65, 499 (1980)〕等により行うことができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いても容易に行い得る。

#### (本発明GD3模倣ペプチドの製造)

本発明GD3模倣ペプチドは、そのアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。該方法には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法が包含される。

かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させ鎖を延長させていくステップワイズエロゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含し、本発明GD3模倣ペプチドの合成は、そのいずれによってもよい。

上記ペプチド合成に採用される縮合法も、各種方法に従うことができる。具体的には、例えばアジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA（ジフェニルホスホリルアジド）法、DCC+添加物（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等）法、ウッドワード法等を例示できる。

これら各方法に利用できる溶媒もこの種ペプチド縮合反応に使用されることがよく知られている一般的なものから適宜選択することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヘキサホスホリアミド、ジオキサソラン、テトラヒドロフラン（THF）、酢酸エチル等および之等の混合溶媒等を挙げることができる。

尚、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸乃至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステル等の低級アルキルエステル；例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステル等のアラルキルエステル等として保護することができる。また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばTyrの水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、第三級ブチル基等で保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に例えばArgのグアニジノ基は、ニトロ基、トシル基、2-メトキシベンゼンスルホニル基、メタンスルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基等の適当な保護基により保護することができる。

上記保護基を有するアミノ酸、ペプチドおよび最終的に得られる本発明免疫原性ペプチドにおける之等保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンスルホン酸等を用いる方法等に従って、実施することができる。

かくして得られる本発明のGD3模倣ペプチドは、通常の方法に従って、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、向流分配法等のペプチド化学の分野で汎用されている方法に従って、適宜その精製を行うことができる。

また、本発明GD3模倣ペプチドは、当該ペプチドをコードする本発明にかかるDNA配列を利用した遺伝子工学的手法に従い製造することができる。

これら手法は、常法に従うことができ、例えば、DNAの合成、当該DNAの発現を可能とする発現ベクターの製造、該ベクターの宿主細胞における発現方法等は、いずれも一般的な遺伝子工学的手法に準ずることができる（Molecular

Cloning 2d. Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) 等参照)。

例えば、本発明GD 3 模倣ペプチドをコードするDNAは、本発明により提供されるGD 3 模倣ペプチドのアミノ酸配列情報に基づいて、常法に従い調製することができる (例えば、Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983) 等参照)。

より具体的には、DNAの合成は、ホスホルアミダイト法またはトリエステル法による化学合成によることができ、例えば、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置上で行うこともできる。二本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖を共にアニーリングさせるか、または適当なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを用い相補鎖を付加するかによって、化学合成した一本鎖生成物から得ることもできる。

上記DNAにおいては、所望により、そのコードするアミノ酸配列の改変を行うことができ、例えば、オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入法 (Zoller, M., et al., Nucl. Acids Res., 10, 6487-6500 (1982) )、カセット変異誘発法 (Well, J., et al., Gene, 34, 315-323 (1985) ) 等の公知方法を採用することができる。

当該DNAを利用した所望ペプチドの製造および発現は、この分野で周知慣用の技術に従うことができる (例えば、Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 5990 (1983) 等参照)。また、融合ペプチド乃至蛋白としての製造および発現に際しては、例えば、大野らの方法「タンパク実験プロトコール1 機能解析編、細胞工学別冊、実験プロトコールシリーズ、1997 年、秀潤社」等を参考にすることができる。

得られた所望ペプチドは、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分

離操作（「生化学データブック II」、1175-1259 頁、第 1 版第 1 刷、1980 年 6 月 23 日株式会社東京化学同人発行；Biochemistry, 25 (25), 8274-8277 (1986)；Eur. J. Biochem., 163, 313-321 (1987) 等参照）により分離、精製することができる。該方法としては、具体的には、例えば、通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の GD 3 模倣ペプチドは、より好ましくは、GD 3 に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドであり、これは、免疫原性を高めた形態、例えば、免疫原性を高めるキャリア蛋白との融合ペプチド形態や多抗原性ペプチド形態であることができる。

免疫原性を高めるキャリア蛋白との融合ペプチド形態である本発明の GD 3 模倣ペプチドは、本発明にかかるペプチドと免疫原性を高める慣用のキャリア蛋白とを結合させることにより収得される。

上記キャリア蛋白としては、免疫原性を高めることができる限り特に制限はなく、担体効果（carrier effect）により免疫原性を与える各種の蛋白乃至ペプチドあるいは生体の免疫応答を促進する各種蛋白乃至ペプチドを包含する。また、当該キャリア蛋白は、抗腫瘍活性等の医薬作用を併せ持つ蛋白乃至ペプチドであることができる。

本発明の GD 3 模倣ペプチドを医薬として利用する場合には、当該キャリア蛋白は、医薬として許容される蛋白乃至ペプチドから選択され、これらは、好適には、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）や IL-12、GM-CSF 等のサイトカイン等を例示できる。また、上記医薬性の蛋白乃至ペプチドとしては、例えば、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-

2、TNF、TGF- $\beta$ 、アンジオスタチン、トロンボスポンジンおよびエンドスタチン等が例示される。

上記ペプチドとキャリア蛋白との結合は、前記したペプチド合成法に従い実施することができる。

また、これらのDNA乃至遺伝子を利用して、前記した遺伝子組換え技術に従い実施することもできる。

かくして融合ペプチド形態である本発明GD3模倣ペプチドを収得することができる。

また、本発明GD3模倣ペプチドは、多抗原性ペプチド (multiple antigen peptide: MAP) 形態であることができ、これは、基本分子に複数の本発明GD3模倣ペプチドが提示された形態として特徴付けられる。

当該MAP形態である本発明GD3模倣ペプチドは、例えば、基本分子あるいは骨格としてのデンドリマーの利用により好適に製造することができる。

デンドリマーは、一般に樹枝状形状から星形の立体配置を有する球状乃至その他構造の分子として知られており、複数の機能基を有する枝 (繰返し単位) により特徴付けられる (例えば、特表昭60-500295号公報; 特開昭63-99233号公報; 特開平3-263431号公報; 米国特許第4507466号明細書; 同第4568737号明細書; Polymer Journal, 17, p.117 (1985); Angewandte Chem. Int. Engl., 29, 138-175 (1990); Macromolecules, 25, p.3247 (1992) 等参照)。

本発明への利用において、当該デンドリマーは特に制限されることはなく、開始部分となる核構造、該開始核に結合した繰返し単位で構成される内部層 (世代) および各分枝に存在する機能基よりなる外表面を有したものであることができる。

これらデンドリマーの大きさ、形態および反応性等は、開始核部分、世代の数および各世代に用いられる繰返し単位を選択することによって調節することがで



きる。例えば異なる大きさのデンドリマーは、利用される世代の数を増やすことによって容易に得ることができる（例えば、米国特許第4694064号明細書等参照）。

MAP形態である本発明GD3模倣ペプチドの一つの代表例としては、例えば、窒素原子を開始核部分とし、該核部分に結合する $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$ 構造からなる繰返し単位（分枝）を有するデンドリマーの各分枝の最も外側の末端に複数のGD3模倣ペプチドを有するもの、あるいは、Lys、Arg、Glu、Asp等のアミノ酸を開始核部分とし、該核部分に直接結合する繰返し単位を同様の各アミノ酸とし、同様に各分枝末端に複数のGD3模倣ペプチドを有するもの等を例示することができる。

上記窒素原子を開始核部分とするデンドリマーは、常法に従い製造でき、また市販品としても入手できる（Polysciences, Inc., 400 Vally Road, Warrington, PA, 18976 U.S.A.）。同様に、アミノ酸を開始核部分とし、開始核部分に直接結合するアミノ酸を繰返し単位とするデンドリマーは、前記したペプチド合成法に従い製造することができ、また、Fmoc<sub>8</sub>-Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-βAla-Alko 樹脂（渡辺化学工業社製）等の市販品を利用することができる。

より具体的には、上記デンドリマーは、例えば、固相ペプチド合成用の樹脂に、スペーサーを介してまたは介さずに2つのアミノ基を同一のまたは同一でない保護基で保護した $\alpha, \omega$ -ジアミノ酸を繰返し単位として、その繰返し単位を縮合させ、保護基を除去する操作を繰り返すことにより得ることができる。

ここで、固相ペプチド合成用の樹脂としては、通常ペプチド合成に汎用されているもの、例えばポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ポリスチレンポリエチレングリコール樹脂等の末端にクロロメチル基、4-（ヒドロキシメチル）フェノキシ基、4-（（ $\alpha$ -2', 4'-ジメトキシフェニル）-9-フルオレニルメトキシカルボニルアミノメチル）フェノキシ基等を有するものを使用することができる。スペーサーとしては、1個または複数個のアミノ酸を挙げる

ことができる。

$\alpha$ ,  $\omega$ -ジアミノ酸としては、リジン、オルニチン、1, 4-ジアミノ酪酸、1, 3-ジアミノプロピオン酸等が挙げられ、保護基とその除去は、前記ペプチド合成法に従い行い得る。また、機能基としては、アミノ基、カルボキシル基および水酸基等が例示できる。

枝数は、繰り返し単位の縮合と保護基の除去をn回繰り返すことにより2nとなり、具体的には2～16の数が挙げられる。

これらデンドリマーの各分枝末端の機能基を利用して、本発明GD3模倣ペプチドを結合させることにより所望のMAPを収得でき、これは前記したペプチド合成法に従い行い得る。

上記の如くして得られるMAPは、常法に従い、例えば、セファクリールS-300（ファルマシア社製）等のマトリックスでのサイズ排除可能な樹脂を用いたクロマトグラフィー操作等により精製することができる。

本発明にかかるMAPにおいて、各分枝の末端に結合させる本発明GD3模倣ペプチドは、同一のものである必要はなく任意に組合せたものであることもできる。異なるGD3模倣ペプチドの組合せ例としては、例えば、配列番号：1、配列番号：3及び配列番号：4の各アミノ酸配列の組合せ、配列番号：1～4に示される15アミノ酸配列のペプチドと図2に示される9アミノ酸配列のペプチドの組合せ等を例示できる。このような複合型MAPは、投与対象における血中および組織中での安定性、結合された分子の免疫原性等の向上に役立ち、本発明GD3模倣ペプチドによるGD3抗体の産生をより高める場合がある。

また本発明のMAPは、それが有する本発明GD3模倣ペプチドの一部としてもしくは開始核部分に結合させる形で、前記した免疫原性を高めるキャリア蛋白、例えばIL-12やGM-CSF等の免疫応答を促進するポリペプチド等が結合した複合型MAPとすることもできる。更に、本発明のGD3模倣ペプチド以外の、腫瘍細胞上に発現する他のガングリオシド、例えば、GM2、GM3、

GD 1、GD 2、GD 3、GT 3等の模倣ペプチドの1またはそれ以上を、本発明GD 3模倣ペプチドとともにMAPの構成成分として利用することもできる。当該複合型MAPの例としては、配列番号：1～4または図2のアミノ酸配列のペプチドのいずれか1以上と、例えば前記特開平10-237099号公報に開示されているGD 1 $\alpha$ を模倣するレプリカペプチドの組合せ等を例示することができる。

かくして得られるMAP形態である本発明のGD 3模倣ペプチドは、免疫原性において優れており、GD 3に対する抗体の産生を誘起するあるいは抗体産生を増加させる所望の作用を奏し得る。

MAP形態である本発明のGD 3模倣ペプチドは、所望のワクチンとしての作用を示す結果、制癌効果および癌転移抑制効果を奏し得るが、該MAPにおいては、その内部に更に任意の薬剤、例えば、免疫応答を促進させる作用を有する薬剤等を包み込んで投与することができる。これにより、目的とする抗体の誘起をさらに助長または抗体産生を更に増加させることができる等、より高い効果をあげることができる利点がある。

(本発明医薬組成物)

本発明は、前記本発明にかかるGD 3模倣ペプチドを有効成分として含有するヒトを含む動物のための医薬組成物を提供する。

当該医薬組成物は、その有効成分が、癌関連GD 3抗原に対する抗体と結合する作用を利用して、例えば、癌の診断剤等としても有用である。

また、本発明医薬組成物は、より好ましくは、GD 3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドである本発明GD 3模倣ペプチドを有効成分として含有する医薬組成物である。

上記免疫原性ペプチドである本発明GD 3模倣ペプチドは、GD 3を構造的に模倣してGD 3と類似の免疫原性を示す作用を有している。而して、誘起または産生された抗体または補体依存的細胞障害活性化によるあるいは細胞障害性T細

胞の活性化による抗腫瘍作用やGD3を発現する腫瘍細胞におけるGD3を介した細胞間接着の抑制作用等による各種医薬用途に有用である。

当該医薬組成物は、例えば、GD3を認識する抗体の誘起を刺激するかまたは該抗体の産生を増強するためのワクチンとしての使用；抗腫瘍、抗癌または癌転移抑制のための使用；およびGD3発現性の腫瘍または癌、特に、黒色腫、大腸癌、卵巣癌、肝癌、乳癌、脳腫瘍、腎癌、膵臓癌、子宮頸癌、食道癌、肺癌および胃癌からなる群から選ばれる疾患の処置への使用等のための医薬として例示できる。

本発明の医薬組成物は、薬学的有効量の本発明GD3模倣ペプチドと薬学的に許容される担体を含む組成物として調製することができる。

ここで、用いられる薬学的に許容される担体は、当該分野において周知されており、調製される組成物の形態に応じて適宜に選択することができる。例えば、組成物が水溶液形態に調製される場合、上記担体としては、水または生理学的緩衝液等を制限なく利用でき、また、例えばグリコール、グリセロール、オリーブ油のような注入可能な有機エステル等を使用することができる。

また、本発明医薬組成物には、例えば有効成分およびその吸収を安定化または増加させるように作用する任意成分を更に配合することもできる。かかる任意成分としては、例えば、グルコース、スクロースまたはデキストランのような炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンのような抗酸化剤、キレート剤、低分子タンパク質あるいはアルブミンのような安定化剤乃至賦形剤を例示することができる。

また、本発明医薬組成物には、製剤設計上の任意添加剤、例えば通常の各種防腐剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤、吸収促進剤等を適宜配合することができる。これら添加剤の具体例としては、防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、クロロヘキシジン、パラベン類（メチルパラベン、エチルパラベン等）、チメロサル等の真菌および細菌に有効な防腐剤を、等張

化剤としてはD-マンニトール、D-ソルビトール、D-キシリトール、グリセリン、ブドウ糖、マネトース、蔗糖、プロピレングリコール等の多価アルコール類や塩化ナトリウム等の電解質類を、また安定化剤としてはトコフェロール、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、エチレンジアミン四酢酸塩（EDTA）、システイン等をそれぞれ例示できる。

かかる本発明医薬組成物の一具体例としてのリポソーム製剤につき詳述すれば、当該製剤は、酸性リン脂質を膜構成成分とするかあるいは中性リン脂質と酸性リン脂質とを膜構成成分とするリポソームに、本発明GD3模倣ペプチドを保持させることにより得られる。

ここで、膜構成成分としての酸性リン脂質や中性リン脂質としては、特に制限はなく、この種のリポソーム製剤に慣用の各脂質の一種または二種以上を混合して使用することができる。

上記リポソーム膜は、酸性リン脂質を単独で構成成分として用いるかまたは中性リン脂質と酸性リン脂質とを併用して、常法に従い形成される。ここで酸性リン脂質の併用割合は、リポソーム膜構成成分中に約0.1～100モル%程度、好ましくは約1～90モル%、より好ましくは約10～50モル%程度とするのがよい。

上記リポソームの調製に当たっては、例えばコレステロール等を添加することができ、これによりリン脂質の流動性を調製して、リポソームの調製をより簡便なものとすることができる。該コレステロールは通常リン脂質に対して等量まで、好ましくは0.5～1倍等量の量で添加配合されるのが好ましい。

リポソーム分散液中の有効成分と酸性リン脂質との配合割合は、有効成分に対して酸性リン脂質が約0.5～100当量程度、好ましくは約1～60当量程度、より好ましくは約1.5～20当量程度とされるのがよい。また、本発明GD3模倣ペプチドの全脂質中のモル%は、数モル%から数十モル%程度、好ましくは5～10モル%程度までのモル%、通常は5モル%程度でもあってもよい。

尚、上記リボソームの製造、濃縮および粒径コントロール等は、常法に従い実施でき、また、リボソーム製剤には、所望により前記した各種の添加剤等を配合することもできる。

また、上記において、本発明GD3模倣ペプチドは、これに脂肪酸（例えば、ベヘン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、オレイン酸等）、アルキル基、コレステリル基等を結合させて、リボソーム製造に利用することができる。当該リボソーム製剤の製造もまた常法に従い行うことができる（Long Circulating Liposomes: old drugs, New therapeutics., M. C. Woodle, G. Storm, Eds: Springer-Verlag Berlin (1998) 等参照）。

本発明の医薬組成物（製剤）中に含まれる有効成分の量は、薬学的有効量である限りにおいて特に制限されず広範囲から選択することができる。

通常、本発明GD3模倣ペプチドは、製剤中に約0.00001～70重量%、好ましくは約0.0001～5重量%含有される量の範囲から選択されるのが望ましい。また、上記製剤の投与量も、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法（投与経路）、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件等に応じて広範囲から適宜選択することができる。一般に、該投与量は、患者1日当たり体重1kg当たり、有効成分が約0.01 $\mu$ g～10mg程度、好ましくは約0.1 $\mu$ g～1mg程度となる範囲から選ばれるのがよい。該製剤は1日当たり1回投与に限らず、数回に分けて投与することができる。

また、本発明の医薬組成物は、好ましくは前記ワクチン組成物として使用でき、当該使用に際しては、薬学的有効量のアジュバントと併用して投与されるのが、その抗腫瘍効果を高めるためにより好ましい。

ここで、アジュバントとしては、特に制限はなく、例えばフロイント完全アジュバント、ムラミルジペプチド、BCG、IL-12、N-アセチルムラミン-L-アラニル-D-イソグルタミン（MDP）、サイモシン $\alpha$ 1、QS-21等を例示できる。投与されるアジュバントは、その投与後、ヒトまたは動物に対

する免疫反応の一部として表出する皮膚の軟化、痛み、紅斑、発熱、頭痛、筋肉痛等の症状により、制限されるが、患者1日当たり体重1kg当たり、通常約0.1 $\mu$ gから1000 $\mu$ g程度、好ましくは約1 $\mu$ gから数百 $\mu$ g程度が投与される。

更に、本発明医薬組成物は、例えば免疫応答促進ペプチドや癌化学療法剤（抗癌剤）等の他の医薬と併用することができる。これら併用薬の投与量は、当該併用薬の薬学的有効量に依存して適宜決定することができる。例えばGM-CSFを用いる場合、該GM-CSFは通常患者1日当たり体重1kg当たり、約0.1 $\mu$ gから1000 $\mu$ g程度、好ましくは約1 $\mu$ gから数百 $\mu$ g程度が投与される。

尚、上記併用薬としては、5-フルオロウラシル（5-FU）を代表として、各種の癌化学療法剤、例えば、各種アルキル化剤、各種代謝拮抗剤、各種の抗腫瘍性抗生物質製剤、各種の抗腫瘍性植物成分製剤等および前記した抗腫瘍活性を有するサイトカイン等を例示できる。

尚、上記併用に際しては、前記したように、MAP形態である本発明GD3模倣ペプチドの内部への包み込みを利用することもできる。また、併用薬を含有し得る室のあるマイクロデバイスのような薬物送達系物質であって、本発明GD3模倣ペプチドを含むものも同様に利用でき、かかる薬物送達系物質の例としては、例えばリポソーム、透過性若しくは半透過性の膜を含有するマイクロカプセル、他の室を有するマイクロデバイス等の生物学的物質等を挙げることができる。これらは非毒性で、また生分解性であることができる。

これら薬物送達系物質と本発明GD3模倣ペプチドとの結合は、常法に従い実施でき（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab. Press (1988); Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996) 等参照）、また、制癌剤や抗癌活性を有するサイトカイン等を含む医薬組成物の製造は、例えばナンバらの文献（Liposomal

applications to cancer therapy, Y. Namba, N. Oku, J., Bioact. Compat. Polymers, 8, 158-177 (1993)) 等を参照できる。

尚、本発明医薬組成物を診断剤として利用する場合、有効成分である本発明GD3模倣ペプチドは、その検出のために、例えば標識化されていることができる、当該標識化は、常法に従い、例えば、放射性化合物、蛍光物質、酵素、ピオチン、造影剤等を利用するものであることができる。

かかる診断剤の利用によれば、癌組織や癌細胞または血液等の体液等の各種サンプル中の抗GD3抗体を検出でき、例えば、癌の診断や病態の把握等に有用である。

#### (本発明DNA)

本発明によれば、本発明GD3模倣ペプチドをコードする配列からなるDNAが提供される。当該DNAは、前記した、本発明GD3模倣ペプチドの遺伝子工学的手法による製造に有用である。また、当該DNAは、これを有効成分とするDNAワクチンに好適に利用することができる。

上記本発明GD3模倣ペプチドをコードするDNAは、前記したとおりであり、これは好ましくは、GD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドである本発明GD3模倣ペプチドをコードするDNAであり、更には前記した特に好ましいとされた本発明GD3模倣ペプチドをコードするDNAであることができる。

上記ワクチンは、GD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドである本発明GD3模倣ペプチドをコードするDNAを利用し、当該DNA自体またはこれを発現可能とする組換え発現ベクターを有効成分とする医薬組成物からなる。

当該医薬組成物は、ヒトを含む哺乳類の癌細胞または癌組織を標的とするDNAワクチンとして有用であり、前記した本発明GD3模倣ペプチドを有効成分とする医薬組成物と同様の使用において有用である。



上記DNAワクチンは、医薬として許容可能な担体を利用して常法に従い医薬組成物として調製でき、例えば、滅菌生理食塩水または滅菌緩衝化生理食塩水等の生理的に許容できる溶液中にあることが望ましい。また、当該組成物は、前記した本発明GD3模倣ペプチドを有効成分とする医薬組成物の場合と同じく、リポソーム製剤であることができ、また、アジュバント等と併用することもできる。

更に、当該医薬組成物には任意の薬剤や添加物を含ませることもでき、例えば、カルシウムイオン等のDNAの細胞内取込みの助けとなる薬剤を例示することができる。また、トランスフェクションを容易にする、上記リポソームのほか、フルオロカーボン乳剤、コクリエート (cochleate)、チューブル (tubule)、金粒子、生分解性マイクロスフェアおよびカチオン性ポリマー等を同様に例示できる。

ワクチン宿主に導入される発現可能なDNAまたは転写されたRNAの量は、非常に広い投与範囲から選択され、これは、例えば使用される転写および翻訳プロモーターの強さにも依存する。更に、免疫応答の大きさは、タンパク質発現のレベルと発現された遺伝子産物の免疫原性によっても影響される。一般的に、DNAの約1 ng～5 mg、100 ng～2.5 mg、1 μg～750 μg、好ましくは約10 μg～300 μgの効果的投与範囲が非経口投与される。これは、一般には、直接、筋肉組織に投与され、また、皮下注射、真皮導入、皮膚圧痕および腹腔内送達、静脈内送達または吸入送達等の他の投与方法も採用される。

一般に、投与は、一度ではなく、投与後の状態をみながら、1から複数回の追加ワクチンをすることでより効果を高めることが可能となる。また、DNAワクチン投与後、前記した本発明GD3模倣ペプチドからなる医薬組成物で追加免疫することも可能である。更に、前記した各種の併用も治療効果を高める可能性がある。

尚、上記DNAワクチンにおいて、当該DNAを発現可能とする組換え発現ベクターは、この種のDNAワクチンに慣用のあるいは当該利用が可能とされる各種の発現ベクターを制限なく利用することができ、その製造も常法に従うことが

できる。

(本発明抗体)

本発明GD3模倣ペプチドは、これを抗原として新たな抗体、即ち、GD3に結合性を有し、それ故、GD3を発現する例えば悪性腫瘍細胞（メラノーマ細胞等）に結合して、該細胞の増殖を抑制したり、転移を抑制する活性を発揮する抗体（中和抗体）を製造することができ、本発明に係る抗体をも提供するものである。

またかかる抗体の製造は、本発明のGD3模倣ペプチドにおいて、これがGD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドであることの確認のための試験としても把握することができる。

本発明抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両者が包含され、之等はいずれも、本発明GD3模倣ペプチドを免疫抗原として利用して、慣用される技術に従って製造することができる。

モノクローナル抗体の製造につき詳述すれば、該抗体は、例えば上記免疫抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）と哺乳動物の形質細胞腫細胞（ミエローマ細胞）との融合細胞（ハイブリドーマ、hybridoma）を作成し、これより所望のGD3を認識する抗体（モノクローナル抗体）を産生するクローンを選択し、該クローンを培養することにより実施できる。かかるモノクローナル抗体の製造は、基本的には常法に従うことができる（例えば、Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 15, 105 (1975); Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 10, 201 (1976); Koscielak, J., Eur. J. Biochem., 37, 214 (1978) 等参照）。

該方法において、免疫抗原で免疫される哺乳動物としては、特に制限はないが細胞融合に使用される形質細胞腫細胞との適合性を考慮すれば、一般には、マウス、ラット等が有利に用いられる。免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等により投与することにより実施できる。

より具体的には、例えばマウスの場合、免疫抗原を生理食塩水含有リン酸緩衝液（PBS）や生理食塩水等で適当濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2～14日毎に数回投与し、総投与量が約100～500 $\mu$ g/マウス程度になるようにするのが好ましい。上記アジュバントとしては、百日咳ワクチン、完全フロイドアジュバント、アラム等を好ましく利用できる。また免疫細胞としては、上記最終投与の約3日後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物の形質細胞腫細胞としては、既に公知の種々のものを使用でき、また、融合反応も、公知の方法、例えばマイルスタイン（Milstein）らの方法（Method in Enzymology, 73, 3 (1981)）等に準じて行なうことができる。得られるハイブリドーマの分離とクローニングも、常法に従い実施できる。

目的抗体産生株の検索は、例えばELISA法（Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980)）、プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクタルニー（ochterlony）法、ラジオイムノアッセイ（RIA）法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30-53頁、昭和57年3月5日）に従い実施することができ、この検索には前記免疫抗原およびGD3が利用できる。

かくして得られるGD3を認識する所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することができ、また液体窒素中で長期間保存することができる。上記ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の採取は、該ハイブリドーマを常法に従って培養してその培養上清として得る方法やハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

上記方法に従い得られる抗体産生ハイブリドーマ培養上清やマウス腹水は、之

等をそのまま粗製抗体液として用いることができ、また之等は常法に従って、硫酸アンモニウム分画、塩析、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAカラムクロマトグラフィー等のアフィニティクロマトグラフィー等により精製して、精製抗体とすることができる。

#### 実施例

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げるが本発明はこの範囲に限定されるものではない。

尚、用いた略号は以下の通りである。

TBS：トリスリン酸生理食塩水緩衝液

TC：テトラサイクリン

KM：カナマイシン

PEG/NaCl：ポリエチレングリコール／塩化ナトリウム

TFA：トリフルオロ酢酸

#### 実施例 1

##### GD 3 模倣ペプチドの同定

##### (1) ファージディスプレイライブラリーの調製

ニシ、サヤ等の報告 (Nishi T., Saya H., et al., FEBS Letter, 399, 237-240 (1996)) に従って、ファージのコートタンパク質 pIII 遺伝子に 15 残基のランダムなアミノ酸配列ペプチドをコードするランダム DNA を挿入して、ファージ外殻表面にランダムな 15 残基のアミノ酸配列ペプチドを発現できる、所望のファージディスプレイライブラリーを構築した。

該ファージは、TC 耐性遺伝子を有しているため、ファージに感染された大腸菌は TC 耐性株になる。増殖させたファージライブラリーは、0.02%  $\text{NaN}_3$  を含む TBS 溶液に溶解して保存した。

上記で構築されたファージディスプレイライブラリーの特徴は、スコット等に

より報告されている (Scott, J. K. and Smith G. P., Science, 249, 386-390 (1990))。

## (2) 抗GD3モノクローナル抗体の固相化

抗GD3抗体として、抗GD3モノクローナル抗体(4F6)(以下、GD3抗体(4F6)という)を使用した。該GD3抗体(4F6)は、GD3に対するマウスモノクローナル抗体(IgG)であり(Thomas C. P., et al., Glycoconj. J., 13 (3), 377-384 (1996))、ポートカリアン博士(Dr. Jacques Portoukalian; INSERM, France)より譲渡を受けた。

50  $\mu$ lの組換えプロテインAセファロース懸濁液(rProtein A Sepharose Fast Flow; ファルマシアバイオテック製造、コード番号; 17-1279-01、Lot 番号; 237393)を0.5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、TBSを400  $\mu$ l加えた。次いで1mlのGD3抗体(4F6)を加え、よく攪拌しながら、4℃、一晚反応させた。反応後、3000回転/分で5分間遠心し、上清を除き、0.5mlのTBSを加え、よく攪拌した後、新しい1.5mlエッペンドルフ・チューブに移した。さらにTBSを0.5ml加え、3000回転/分、5分間遠心した。上清を除き、1mlのTBSを加え、再度3000回転/分、5分間遠心し、上清を除いた。100  $\mu$ lのTBSを加えて懸濁し、GD3抗体(4F6)の結合した組換えプロテインAセファロース(100  $\mu$ l)とし、使用時まで4℃にて保存した。

50  $\mu$ lの組換えプロテインAセファロース懸濁液を1.5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、TBSを900  $\mu$ l加えた。12mg/mlのマウスイムノグロブリン標準血清(コード番号: RS10-101-2; Bethyl 社製造; コスモバイオ社)のTBS溶液100  $\mu$ lを加えた後、よく攪拌しながら、4℃、一晚反応させた(未反応のプロテインAの存在を極力なくするため、大過剰量のIgGと反応させた)。反応後、3000回転/分で5分間遠心し、上清を除いた。1mlのTBSを加え、よく攪拌したのち、新しい1.5mlエッペンドルフ・

チューブに移し、3000回転/分、5分間遠心し、上清を除いた。この操作を3回繰り返した後、100 $\mu$ lのTBSを加えて懸濁し、およそ250 $\mu$ gのマウスIgGの結合した組換えプロテインAセファロース（100 $\mu$ l）とした。使用時まで4℃にて保存した。

### （3）大腸菌の調製

ファージの宿主大腸菌として、大腸菌K91KAN（カナマイシン耐性株：熊本大学・腫瘍医学講座、佐谷秀幸教授より分与戴いた）を使用した。

即ち、ディスポーザブルの白金耳を用いて上記大腸菌を掻き取り、100 $\mu$ g/mlのカナマイシン（和光純薬社製）を含むNYZプレートに一晚37℃で培養し、翌日、プレートを取り出し、使用時まで4℃にて保存した。

ファージを大腸菌に感染させる前日に、4℃で保存していた上記大腸菌のプレートから白金耳で菌を微量掻き取り、100 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含むNZY培地5mlに殖菌し、37℃、200回転/分で一晩振とう培養した（前培養）。翌日、100 $\mu$ lの前培養液を、新鮮なNZY培地10mlに移し、37℃で4時間振とう培養した。菌体のF-纖毛を発現させるために振盪を止め、30分間放置し、ファージへの感染に用いた。

尚、上記NZY培地は、10gNZアミンA（和光純薬社製；コード番号：541-00241）、5gビール酵母エキス（商品名：エビオス、アサヒビール社製）および5gNaClを精製水1Lに溶解し、5NNaOHを1ml加え、pH7.5に調整し、オートクレーブ滅菌したのち、室温保存したものを使用した。

### （4）ファージの増幅

前記（1）で得られたファージを宿主大腸菌に感染させた。

即ち、各ファージ希釈溶液10 $\mu$ lと上記調製済み大腸菌K91KAN10 $\mu$ lを15ml遠心チューブに加えて室温、15分間反応させたのち、予め37℃に加温しておいたNZY培地（0.2 $\mu$ g/mlTCを含む）1ml加え、37℃、2000回転/分で40分間振とう培養した。各々のチューブから、

200  $\mu$ l を NZY プレート (20  $\mu$ g/ml TC、100  $\mu$ g/ml KM を含む) に蒔き、37℃、一晚培養し、翌日コロニーの数を測定した。

希釈溶液 10  $\mu$ l に大腸菌 K91KAN 10  $\mu$ l を反応させたものをネガティブコントロールとした。これは TC 感受性株のままであるため、TC 含有 NZY プレートでは増殖しなかった。

また、後述のバイオパニングで回収したファージの増幅は以下のように行なった。

即ち、タイター測定に用いる量 (2  $\mu$ l) を除いたファージ溶液全量の入った 1.5 ml エッペンドルフ・チューブに、調製済み大腸菌 K91KAN 100  $\mu$ l を添加し、室温で 15 分間反応させた。反応後、全量を、予め 50 ml 遠心チューブにて 37℃ に保温しておいた、0.2  $\mu$ g/ml の TC を含む 20 ml NZY 培地中に加えた。200 回転/分で 37℃、40 分間振盪培養した。20 mg/ml TC を 20  $\mu$ l 加え、37℃ にて一晚振盪培養を行なった。翌日、3000 回転/分で、10 分間遠心分離を行い、さらに、上清をオークリッジ遠心チューブに移し、12000 回転/分で 10 分間、遠心分離し大腸菌を完全に除去した。上清を別のオークリッジ遠心チューブに移し、3 ml の PEG/NaCl を加え、よく攪拌した後、4℃ にて 4 時間以上静置した。

次いで 12000 回転/分で 10 分間遠心分離を行ない、増幅したファージを沈殿させた。上清を除き、沈殿したファージを 1 ml の TBS で懸濁した。

1.5 ml のエッペンドルフ・チューブに移し、15000 回転/分、10 分間遠心分離し、不溶性の物質を除去した。上清を別のエッペンドルフ・チューブに移し、150  $\mu$ l の PEG/NaCl を加え、よく攪拌した後、4℃ にて 1 時間以上静置した。

15000 回転/分で 10 分間遠心分離を行ない、ファージを再度沈殿させた。上清を除き、0.02%  $\text{NaN}_3$  を含む TBS 200  $\mu$ l でファージを懸濁した。15000 回転/分、10 分間遠心分離を行ない不溶性の物質を沈殿させた。沈

殿を  $500 \mu\text{l}$  エッペンドルフ・チューブに移し、 $4^{\circ}\text{C}$  にて保存した。これを各々のラウンド (Round) における、増幅ファージとした。

尚、ファージのタイター測定は、以下のようにして行った。

各ラウンドで回収されたファージのタイター測定には  $10^2$ 、 $10^3$  および  $10^4$  希釈したものを用い、増幅したファージのタイター測定には  $10^7$ 、 $10^8$  および  $10^9$  希釈したものを用いた。希釈溶液として TBS/ゼラチン (和光純薬社製) を用い、希釈の仕方は以下のように行った。

$10^2$  倍希釈 = ファージ溶液  $2 \mu\text{l}$  + TBS/ゼラチン  $198 \mu\text{l}$

$10^3$  倍希釈 =  $10^2$  倍希釈ファージ溶液  $10 \mu\text{l}$  + TBS/ゼラチン  $90 \mu\text{l}$

$10^4$  倍希釈 =  $10^2$  倍希釈ファージ溶液  $2 \mu\text{l}$  + TBS/ゼラチン  $198 \mu\text{l}$

$10^6$  倍希釈 =  $10^4$  倍希釈ファージ溶液  $2 \mu\text{l}$  + TBS/ゼラチン  $198 \mu\text{l}$

$10^7$  倍希釈 =  $10^6$  倍希釈ファージ溶液  $10 \mu\text{l}$  + TBS/ゼラチン  $90 \mu\text{l}$

$10^8$  倍希釈 =  $10^6$  倍希釈ファージ溶液  $2 \mu\text{l}$  + TBS/ゼラチン  $198 \mu\text{l}$

$10^9$  倍希釈 =  $10^8$  倍希釈ファージ溶液  $10 \mu\text{l}$  + TBS/ゼラチン  $90 \mu\text{l}$

ファージタイターの計算方法は以下の通りで行った。

タイター / ml = コロニー  $\times 1020 (\mu\text{l}) / 200 (\mu\text{l}) \times 1000 (\mu\text{l}) / 10 (\mu\text{l}) \times$  希釈率

また、回収されたファージの総タイターは、上記の値に、回収された溶液の総量 (ml) を掛けることで算出した。

反応に用いたファージのタイターが  $6.2 \times 10^{10}$  であるため、(回収されたファージの総タイター /  $6.2 \times 10^{10}$ )  $\times 100$  を回収率 (%) とした。

#### (5) 抗 GD3 抗体に結合するファージクローンの選択 (バイオパニング)

GD3 抗体 (4F6) に特異的に結合するペプチドを発現しているファージクローンの選択 (バイオパニング) は、同抗体の Fab 領域に結合するファージを効率良く得るために、予め、標準マウス IgG および組換えプロテイン A セファロースに結合するファージを排除した後、GD3 抗体 (4F6) とファージライ



ブラリーとを反応させた。

即ちパイオパニングは以下の手順で行なった。

第1ラウンド：

標準マウスIgG-組換えプロテインAセファロース10 $\mu$ lおよび組換えプロテインAセファロース50 $\mu$ lをPBS340 $\mu$ lに溶解し、ファージライブラリー10 $\mu$ l ( $6.2 \times 10^{10}$ タイター)を添加し、500 $\mu$ lエッペンドルフ・チューブにて、4℃一晩反応させた後、3000回転/分、3分間遠心分離し、予め、標準マウスIgGおよび組換えプロテインAセファロースに結合するファージを排除した。

上記で得られた380 $\mu$ lの上清と前記(2)で得たGD3抗体(4F6)-組換えプロテインAセファロース50 $\mu$ lを500 $\mu$ lエッペンドルフ・チューブに移して、4℃5時間反応させた後、3000回転/分、3分間遠心分離した。

上清を除き、1mlのPBSを加え懸濁した後、1.5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、3000回転/分、3分間遠心分離した。この操作を2回繰り返した後、上清を除き、500 $\mu$ lのPBSを加え懸濁した。この懸濁液を500 $\mu$ lのエッペンドルフ・チューブに移し、3000回転/分、3分間遠心分離した。上清を除き、50 $\mu$ lの抽出緩衝液を加え、室温に15分間放置した(3分おきに穏やかに攪拌した)後、3000回転/分、3分間遠心分離した。得られた上清をコンセンレーター(Centricon<sup>TM</sup> 30 Concentrator: アミコン社製)に移し、75 $\mu$ lの1Mトリス(pH9.1)を加えて中和した後、2mlのTBSを加えた。

更に5000回転/分、20分間遠心分離した後、2mlのTBSを加え、再度5000回転/分、20分間遠心分離した。

セントリコンのフィルター上に残っているファージ溶液を1.5mlのエッペンドルフ・チューブに移した。フィルターを50 $\mu$ lのTBSで洗浄し、先のファージ溶液のエッペンドルフ・チューブに加えた(総量は470 $\mu$ l)。

## 第2ラウンド：

上記第1ラウンドで得られた、増幅させたファージ $100\mu\text{l}$ と標準マウスIgG-組換えプロテインAセファロース $10\mu\text{l}$  ( $25\mu\text{g}$ )をPBSの $350\mu\text{l}$ に溶解し、 $500\mu\text{l}$ エッペンドルフ・チューブに加えて、 $4^{\circ}\text{C}$ 一晩反応させた後、組換えプロテインAセファロース $50\mu\text{l}$ を加えて、 $4^{\circ}\text{C}$ 一晩反応させた。3000回転/分、3分間遠心分離して上清 $500\mu\text{l}$ を得た。

上記で得た $500\mu\text{l}$ の上清を1.5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、それに抗GD3抗体溶液を1ml加え、 $4^{\circ}\text{C}$ 一晩反応させた後、3000回転/分、3分間遠心分離した。

さらに、組換えプロテインAセファロース $50\mu\text{l}$ を加え $4^{\circ}\text{C}$ 、3時間反応させた後、3000回転/分、3分間遠心分離した。この溶液の上清を除き、1mlのTBSを加えて懸濁した。この懸濁液を1.5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、3000回転/分、3分間遠心分離した。この操作を2回繰り返した。次いで上清を除き、 $50\mu\text{l}$ の抽出緩衝液を加え、室温に15分間放置した(3分おきに穏やかに攪拌した)。3000回転/分、3分間遠心分離した後、上清をコンセントレーターに移し、 $75\mu\text{l}$ の1Mトリス(pH9.1)を加えて中和し、2mlのTBSを加えた。5000回転/分、20分間遠心分離し、2mlのTBSを加え、再度5000回転/分、20分間遠心分離した。セントリコンのフィルター上に残っているファージ溶液を1.5mlのエッペンドルフ・チューブに移した。フィルターを $50\mu\text{l}$ のTBSで洗浄し、先のファージ溶液をエッペンドルフ・チューブに加えた(総量 $230\mu\text{l}$ )。

## 第3ラウンド：

上記第2ラウンドで増幅させたファージ $100\mu\text{l}$ を用い、第1ラウンドの方法に順じた手順でファージを抗GD3抗体溶液と反応させて増幅したファージを得た。このようにして得られ、セントリコンによる遠心分離で回収された溶出液の総量は $110\mu\text{l}$ であった。

上記3回のパンニングの結果（各ラウンド後のファージ・クローンの回収率）を下記表1に示す。

表1

タイター／ウエル	fd wild type	GD3R-1	GD3R-2	GD3R-3	GD3R-4
10 <sup>9</sup>	0.024	0.017	0.055	0.05	0.109
10 <sup>9</sup>	0.08	0.026	0.034	0.086	0.116
10 <sup>10</sup>	0.045	0.067	0.128	0.058	0.14
10 <sup>10</sup>	0.044	0.055	0.109	0.017	0.102
10 <sup>11</sup>	0.03	0.094	0.049	0.094	0.386
10 <sup>11</sup>	0.029	0.086	0.012	0.108	0.315

尚、表1中、「fd wild type」とは、実施例1で用いられたライブラリーのものとの野生株であり、ペプチドが挿入されていないファージである。このものは、ファージペプチドライブラリーのファージを構成する遺伝子からなるファージベクターのペプチド挿入部位を制限酵素で切断、除去し、残ったベクターを再度結合（ライゲーション）して作製されたベクターで、大腸菌JM109（タカラ社より購入）を形質転換（トランスフォーメーション）し、得られた形質転換体をNZY培地で一晚培養し、産生、増殖させたファージを回収して、本試験に利用した。

上記で3回のパンニングで得られたファージクローンが発現しているペプチドの配列決定を以下のとおり行った。

即ち、3回目のバイオパンニング後のタイター測定で得られたプレート上のコロニーをそれぞれ32コロニーずつ、無作為に拾い上げ、新しいNZYプレートに植菌し直し、一晚37℃にて培養し、これをマスタープレートとして4℃で保存した。

マスタープレートのコロニーを各々20mlのNZY培地（20μg/ml TC含有）の入った50ml遠心チューブに懸濁し、37℃で一晩200回転／分で振盪培養した。

3000回転/分、10分間遠心分離を行った後、上清をオーク・リッジ遠心チューブに移し、12000回転/分で10分間遠心分離し、大腸菌を除菌した。更に上清をオーク・リッジ遠心チューブに移し、3mlのポリエチレングリコール(PEG6000、ナカライテスク社製)/NaClを加え、よく攪拌した後、4℃に4時間静置した。12000回転/分で10分間遠心分離し、ファージを沈殿させた。ついで上清を除去し、沈殿したファージを1mlのTBS(トリス緩衝塩溶液)に懸濁させた。1.5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、15000回転/分で10分間遠心分離し、不溶性物質を除去後、上清を別のエッペンドルフ・チューブに移し、150 $\mu$ lのポリエチレングリコール/NaClを加え、よく攪拌した後、4℃に1時間静置した。

15000回転/分で10分間遠心分離し、ファージを再沈殿させた。上清を除去し、沈殿したファージを200 $\mu$ lのTBSで再度懸濁した。15000回転/分で10分間遠心分離し、不溶性物質を沈殿させた後、該沈殿物を0.5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、ファージクロンを4℃で保存した。

上記で得られたファージクロンからのDNAの抽出は、1.5mlのエッペンドルフ・チューブに、ファージクロン100 $\mu$ lに対してTBS100 $\mu$ lおよびTE飽和フェノール(ニッポジーン社製)200 $\mu$ lを加えて、10分間激しく攪拌後、15000回転/分で10分間遠心分離した。次いで、上清(水相)200 $\mu$ lに対してTE飽和フェノール200 $\mu$ lおよびクロロホルム200 $\mu$ lを加えて、前記と同様に10分間激しく攪拌後、15000回転/分で10分間遠心分離した。更に、上清(水相)150 $\mu$ lに対してTE250 $\mu$ l、3M酢酸ナトリウム40 $\mu$ l、20mg/mlグリコーゲン(ベーリンガー・マインハイム社製)1 $\mu$ lおよびエタノール1mlを加えて、1.5mlのエッペンドルフ・チューブにて-20℃で一時間放置した後、15000回転/分で10分間遠心分離した。上清を取り除き、1mlの80%エタノール(-20℃)を緩やかに加えて、15000回転/分で10分間遠心分離し残存

する塩を除いた。上清を除去後、チューブ内の水分を蒸発させ、沈殿しているDNAを10  $\mu$  lの滅菌蒸留水に溶解し、4℃にて保存した。

かくして得られた個々のファージDNAをペプチドのアミノ酸配列決定のために使用した。

#### (6) 選別されたペプチドのアミノ酸配列決定

ファージDNAによりコードされるペプチドのアミノ酸配列の決定は、ダイタミネーター法により、パーキンエルマー社のDNAシーケンスキット (DNA Sequence Kit, Perkin Elmer, Code; 402079, Lot; A6L015) を用いて、該キットに添付の仕様書に準じて実施した。プライマーのDNA配列は、配列番号：10に示されるとおりであり、これは自動DNA合成機で合成した。

DNAの伸長反応は、パーキンエルマー社のサーマルサイクラーモデル9600を用いて、96℃10秒、50℃5秒、60℃4分を1サイクルとして、25サイクル行い、DNAの配列は、ABI社製のDNAシーケンサー (ABI PRISM™ 377 DNA シーケンサー) を用いて決定した。

32クローンのうち、配列決定できた27クローンのDNA配列は、4種の配列に分類できた。これら4種類の配列のペプチドをGD3模倣ペプチドとし、それぞれ出現頻度の高い順に「GD3R-1」、「GD3R-2」、「GD3R-3」および「GD3R-4」と命名した。

かくして決定された4種のGD3模倣ペプチドのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3および配列番号：4として示されるとおりであり、また、これら4種のアミノ酸配列をコードするDNA配列は、それぞれ配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7および配列番号：8として示されるとおりであった。

#### 実施例2 (GD3模倣ペプチドと抗GD3抗体との結合親和性 (ELISA))

実施例1で得られた各々のファージクローンの $10^{11}$ 、 $10^{10}$ および $10^9$ タイター/100  $\mu$  lの0.1M NaHCO<sub>3</sub>溶液を、96穴マイクロタイター

プレート（ヌンク社製）に添加し、室温にて1時間固定した。上清を除き、400 ml のブロッキング溶液（1% BSA、0.1% スキムミルク、0.02% ツイーン20を含むTBS、pH7.5）を加え、37℃で4時間ブロッキングを行った。

上清を除き、1次抗体としてのGD3抗体（4F6）を100  $\mu$  l ずつ添加した。室温にて2時間振盪しながら、反応させた。反応後、上清を除き、各ウェルを400  $\mu$  l の洗浄液（0.05% ツイーン20を含むTBS）で6回洗浄し、予め調製しておいたブロッキング溶液で5000倍に希釈した2次抗体（抗マウスIgG-HRP、サンタクルズ・バイオテクノロジー社製、カタログ番号：SC-2031、ロット番号：C089）を100  $\mu$  l ずつ添加し、室温にて振盪しながら、1時間反応した。反応後、各ウェルを400  $\mu$  l の洗浄液で4回洗浄し、検出試薬（TMB Microwell; KPL 社製、カタログ番号：50-76-04、ロット番号：WF075）100  $\mu$  l を加え、室温5分間静置した。

1N塩酸を100  $\mu$  l 添加して反応を停止した後、各ウェルの450 nmおよび620 nmの吸光度を測定し、(OD450-OD620) の値を算出した。吸光度の測定にはラボシステムズ（Labosystems）社製のマルチスキャンを使用した。ファージを固定していないウェルをブランクとし、その値を差し引いた値を各ウェルの吸光度とした。

結果を図1に示す。

図1より、GD3抗体（4F6）との結合親和性は、GD3R-4がもっとも強いことが明らかとなった。

### 実施例3（GD3模倣ペプチドの合成と抗GD3抗体との結合親和性）

#### （1）GD3模倣ペプチドの合成

実施例1で得られた4種のGD3模倣ペプチドを以下の方法により合成した。

即ち、全自動ペプチド合成機（ACT357、アドバンスケムテック社製）を使用し、同社のプログラムに従い、Fmoc/NMP、HOBt法

[Fmoc : 9-フルオレニルメトキシカルボニル、NMP : N-メチルピロリドン、HOBt : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール] による各ペプチドの固相合成を実施した。

C端フリー (OH) のペプチドは、配列番号 : 1 ~ 4 に示されるアミノ酸配列に従って、C端アミノ酸に相当するFmoc-アミノ酸-Alko樹脂 0.25 mmol に、C端より2番目以降の各アミノ酸に相当するFmoc-アミノ酸を順次、合成プログラムに従い伸長反応させた。

またC端アミドの各ペプチドは、Fmoc-NH-SAL樹脂 0.25 mmol にC端アミノ酸に相当するFmoc-アミノ酸を合成プログラムに従い縮合反応させ、その後、C端より2番目以降の各アミノ酸に相当するFmoc-アミノ酸を順次縮合反応させて鎖伸長を行った。

各反応終了後、プログラムに従って、N端Fmoc基の脱保護反応を行った。

かくして得られた各ペプチド樹脂をポリプロピレン製のミニカラム (アシスト社製) に回収し、メタノール洗浄後、真空で乾燥し、以下の操作に付してペプチドを樹脂から切り出し、側鎖の脱保護反応を行った。即ち、各樹脂にリエージェント K (Reagent K, 82.5%TFA, 5%phenol, 5%H<sub>2</sub>O, 5%チオアニソール (Thioanisole) および 2.5%エタンジチオール) 2 ml を加え、ミニカラム中で 60 分間反応させた。

次いで、反応液を冷ジエチルエーテル 8 ml 中に滴下して反応を停止させ、同時にペプチドを沈殿させた。更に、ミニカラムをTFA 2 ml にて洗浄し、冷ジエチルエーテル 5 ml を追加し、遠心し、沈殿をジエチルエーテル 10 ml で 4 回洗浄後、約 5 ml の 50%アセトニトリルでペプチドを可溶化し、凍結乾燥した。更に可溶化と凍結乾燥操作を 2 回繰り返して、所望の粗凍結乾燥品を得た。

これをオクタデシルカラム (直径 20 × 250 mm、YMC社製) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分画し、所望のペプチドを単離した。

尚、上記において用いた樹脂およびアミノ酸誘導体は、いずれも渡辺化学工業社製のものである。

かくして単離された各ペプチドは、アミノ酸配列分析およびマスペクトロメトリーによる分子量測定により同定した。

## (2) 多抗原性ペプチドの合成

上記で得たGD3模倣ペプチドの多抗原性ペプチド (MAP: multi antigen peptide) を、Fmoc-MAP-Alk樹脂 (渡辺化学工業社製) を用いて合成した。

Fmoc-MAP-Alk樹脂 (Fmoc<sub>8</sub>-Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-βAla-Alk樹脂) とGD3模倣ペプチドとの反応は、上記固相合成法と同様にして実施した。

得られたMAPの構造は、アミノ酸残基の一文字表示により示せば、それぞれ以下の通りである。

配列番号: 1 のペプチドのMAP:

(LAPPRPRSELVFLSV)<sub>8</sub>-Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-βAla

配列番号: 2 のペプチドのMAP:

(PHFDSL LYPCELLGC)<sub>8</sub>-Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-βAla

配列番号: 3 のペプチドのMAP:

(GLAPPDYAERFFLLS)<sub>8</sub>-Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-βAla

配列番号: 4 のペプチドのMAP:

(RHAYRSMAEWGFLYS)<sub>8</sub>-Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-βAla

## (3) 抗GD3抗体との結合親和性

上記で得られたMAP形態である本発明GD3模倣ペプチドの0.1M NaHCO<sub>3</sub>溶液を100ng/100μlの濃度で96穴マイクロタイタープレートに各ウェルに添加し、室温にて1時間固定し、その後、実施例2のELISA法と同様の操作を行って、GD3抗体(4F6)との結合親和性を調べた。



尚、対照として、抗GD2抗体および抗OAcGD3抗体 (Cerato, E., et al., Hybridoma, 16 (4), 307-316 (1997)) を使用した (ポートカリアン博士より譲渡を受けた)。

結果を下記表2に示す。

表2

血清%	100%	50%	25%	12.50%
抗GD3抗体				
GD3R-1	0.263	0.137	0.127	0.083
GD3R-2	0.264	0.159	0.105	0.055
GD3R-3	0.483	0.357	0.237	0.176
GD3R-4	0.381	0.309	0.229	0.144
抗GD2抗体				
GD2R-1	0.123	0.095	0.067	0.065
GD2R-2	0.132	0.079	0.071	0.052
GD2R-3	0.191	0.036	0.118	0.077
GD2R-4	0.149	0.103	0.072	0.061
抗OAcGD3抗体				
GD3R-1	0.053	0.046	0.041	0.04
GD3R-2	0.038	0.027	0.023	0.021
GD3R-3	0.044	0.031	0.026	0.031
GD3R-4	0.061	0.047	0.043	0.045

表2より、GD3R-3とGD3R-4は、抗GD3抗体との結合が他よりも強く、また、どのペプチドにおいても、抗GD3抗体との結合が対照抗体よりも強いことが判明した。

#### (4) 融合ペプチドの合成

上記で得たGD3模倣ペプチドおよびそのMAPを用いてKLHとの融合ペプチドを合成した。

即ち、0.25%グルタルアルデヒドのPBS (pH7.4) 溶液に各合成ペプチド又はそのMAPとKLHを重量比1/10にて加え、室温で一晩反応させ、各融合ペプチドを合成した。

実施例4 (GD3模倣ペプチドによる免疫)

(1) 免疫:

実施例3(2)で得た4種類のGD3模倣ペプチド(MAP)を $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でPBSに溶解した。これをフロイント完全(または不完全)アジュヴァントと合わせ(1:1、容量比)、エマルジョンを作製した。

8匹のマウス(C57BL/6)のそれぞれに、上記エマルジョンの $0.2\text{ml}/\text{匹}$ (ペプチド量 $5\mu\text{g}/\text{匹一回}$ )を皮下投与して免疫した。投与は2週間毎に行い(但し、2回目の投与以降ではフロイント不完全アジュヴァントを用いた)、各投与の1週間後にそれぞれのマウスの後尾より採血して、抗血清を調製した。

一回目投与後に得た抗血清を「1st」と、二回目のそれを「2nd」と、また3回目のそれを「3rd」とする。

(2) 抗血清の力価測定(ELISA):

上記(1)で得られた各抗血清( $3\times 8\text{匹}=24$ サンプル)のGD3に対する力価を、以下の通りELISA法により測定した。

GD3はメラノーマより抽出、精製されたもの(J. Portoukalian et al., Int. Cancer, 49, 893-899 (1991))を使用した(ポートカリアン博士より譲渡を受けた)。GD3は、シリカゲルSi60(米国メルク社製)カラムを用い、日立L-6200装置によるHPLCで精製した。カラムに吸着したGD3はイソプロパノール/ヘキサン/精製水の混液(55/35/12から55/30/15(容量比))によるグラジエントで溶出した。カラムの流速は毎分 $4\text{ml}$ とした。

かくして得られた精製GD3をメタノールに溶解して $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のGD3溶液を調整した。96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに、上記GD3溶液をウェル当たり $10\mu\text{l}$ (GD3として $100\text{ng}$ )ずつ添加し、メタノールを蒸発させた。次いで、各ウェルにブロッキング溶液(1%BSAを含むTBS)を $50\mu\text{l}$ ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ で4時間ブロッキングした。

上清を除き、上記(1)で得た抗血清を上記ブロッキング溶液で100倍、4

00倍および1600倍に希釈した希釈液のそれぞれ50 $\mu$ lを、各ウェルに加え、4℃で一晩反応させた。各ウェルをTBSで6回洗浄した後、ブロッキング溶液で5000倍に希釈したHRP標識マウスIgG抗体を50 $\mu$ lずつ加え、室温にて2時間反応させた。TBSで4回洗浄した後、各ウェルの酵素活性（ペルオキシダーゼ）をTMB溶液50 $\mu$ lで検出し、1N塩酸50 $\mu$ lで反応を停止したのち、(420nm-620nm)の値を算出した。

対照として、無関係のペプチド（実施例1で得られた4種類のペプチド配列とは異なる15残基の配列を有するペプチドであって、抗GD3抗体と結合親和性を示さないペプチド、その配列は、配列番号：10に示す）を、実施例3の合成法と同様にして合成し、マウスに投与して免疫し、得られた抗血清をコントロールとして、その力価を同様にして求めた（但し、供試マウス数は5匹とし、100倍希釈液のみを用いた）。尚、このコントロールペプチドも前記と同様にしてMAPとして使用した。

各抗血清のGD3に対する反応性を求めた結果を下記表3～表5に示す。

表 3

GD3R-1				GD3R-2			
サンプル番号	希釈倍率			サンプル番号	希釈倍率		
	1/100	1/400	1/1600		1/100	1/400	1/1600
1-1st	0.034	0.017	0.004	1-1st	0.316	0.252	0.179
2nd	0.082	0.026	0.01	2nd	0.34	0.241	0.13
3rd	0.023	0.01	0.003	3rd	0.113	0.099	0.036
2-1st	0.052	0.039	0.007	2-1st	0.062	0.035	0.022
2nd	0.087	0.027	0.016	2nd	0.183	0.078	0.039
3rd	0.068	0.019	0	3rd	0.08	0.075	0.023
3-1st	0.047	0.026	0	3-1st	0.042	0.031	0.053
2nd	0.14	0.063	0.022	2nd	0.135	0.049	0.035
3rd	0.066	0.017	0.002	3rd	0.053	0.053	0.014
4-1st	0.106	0.057	0.005	4-1st	0.114	0.068	0.028
2nd	0.188	0.088	0.034	2nd	0.142	0.071	0.025
3rd	0.084	0.03	0.008	3rd	0.057	0.084	0.008
5-1st	0.03	0.024	0	5-1st	0.087	0.05	0.045
2nd	0.102	0.074	0.019	2nd	0.131	0.034	0.016
3rd	0.139	0.054	0.003	3rd	0.184	0.161	0.053
6-1st	0.055	0.052	0.008	6-1st	0.155	0.078	0.028
2nd	0.117	0.047	0.019	2nd	0.115	0.091	0.033
3rd	0.084	0.021	0.001	3rd	0.09	0.089	0.028
7-1st	0.059	0.034	0	7-1st	0.076	0.055	0.014
2nd	0.168	0.06	0.014	2nd	0.072	0.039	0.016
3rd	0.121	0.051	0.004	3rd	0.05	0.059	0.012
8-1st	0.061	0.027	0.016	8-1st	0.084	0.044	0.034
2nd	0.054	0.039	0.024	2nd	0.069	0.047	0.034
3rd	0.08	0.03	0	3rd	0.098	0.086	0.023

表 4

GD3R-3				GD3R-4			
サンプル番号	希釈倍率			サンプル番号	希釈倍率		
	1/100	1/400	1/1600		1/100	1/400	1/1600
1-1st	0.062	0.071	0.015	1-1st	0.086	0.032	0.007
2nd	0.08	0.054	0.024	2nd	0.122	0.058	0.019
3rd	0.047	0.022	0.016	3rd	0.116	0.053	0.013
2-1st	0.169	0.083	0.017	2-1st	0.042	0.021	0.014
2nd	0.116	0.078	0.025	2nd	0.08	0.07	0.022
3rd	0.126	0.039	0.027	3rd	0.088	0.042	0.008
3-1st	0.105	0.077	0.009	3-1st	0.071	0.047	0.014
2nd	0.098	0.079	0.025	2nd	0.164	0.114	0.026
3rd	0.143	0.032	0.026	3rd	0.176	0.093	0.029
4-1st	0.062	0.004	0.016	4-1st	0.247	0.108	0.052
2nd	0.08	0.112	0.034	2nd	0.195	0.128	0.062
3rd	0.069	0.028	0.018	3rd	0.253	0.111	0.026
5-1st	0.098	0.048	0.006	5-1st	0.086	0.033	0.009
2nd	0.165	0.118	0.022	2nd	0.153	0.093	0.033
3rd	0.189	0.073	0.017	3rd	0.19	0.104	0.022
6-1st	0.051	0.016	0.023	6-1st	0.08	0.041	0.008
2nd	0.132	0.088	0.027	2nd	0.124	0.106	0.031
3rd	0.189	0.033	0.018	3rd	0.168	0.098	0.039
7-1st	0.04	0.026	0.003	7-1st	0.063	0.034	0.006
2nd	0.135	0.076	0.018	2nd	0.147	0.079	0.041
3rd	0.073	0.03	0.013	3rd	0.113	0.045	0.013
8-1st	0.165	0.067	0.031	8-1st	0.082	0.037	0.012
2nd	0.179	0.088	0.07	2nd	0.05	0.057	0.013
3rd	0.098	0.023	0.018	3rd	0.147	0.061	0.024

表 5

コントロールペプチド	
サンプル番号	希釈倍率
	1/100
1-1st	0.105
2nd	0.064
3rd	0.006
2-1st	0.088
2nd	0.056
3rd	0
3-1st	0.057
2nd	0.042
3rd	0.007
4-1st	0.041
2nd	0.028
3rd	0.004
5-1st	0.051
2nd	0.031
3rd	0.031

上記表 3～5 に示されるとおり、本発明 GD 3 模倣ペプチドを免疫原として得られる抗血清は、GD 3 と反応性を有することが明らかとなり、特に GD 3 R-4 を免疫原として得られた抗血清は、GD 3 に対する高い反応性を示すことが明らかとなった。これに対して、コントロールペプチドを用いて得られた抗血清では、その GD 3 に対する反応性は弱く、このことから、本発明 GD 3 模倣ペプチドを用いて得られる抗血清は GD 3 と交叉反応するものであることが示唆された。

この結果は、本発明 GD 3 模倣ペプチドが GD 3 の構造の一部、つまり抗 GD 3 抗体 4 F 6 が認識する構造を模倣することを示唆している。特に GD 3 R-4 は、この傾向の強いことが示唆された。

#### 実施例 5 (GD 3 模倣ペプチドの反応性)

(1) 実施例 3 と同様にして GD 3 R 1、GD 3 R 2、GD 3 R 3 又は GD 3 R 4 のアミノ酸配列の N 末端 9 アミノ酸残基又は C 末端側 9 アミノ酸残基

からなるペプチドを合成した。本試験で用いたペプチドの名称と配列を図2に示した。これらを多抗原性ペプチド (MAP) として用いた。

(2) 図1の抗GD3抗体と4F6とGD3模倣ペプチドとの結合を更に検討する目的で、多抗原性ペプチド (MAP) を用いてELISAを行った。図3の横軸に示した濃度のMAPをそれぞれ、96well プレートに固相化し、ブロッキング液 (1% BSA、0.1% スキムミルク、0.02% Tween 20 を含む TBS) で一晩4℃でブロッキングした後、4F6 (ハイブリドーマ上清: 原液で使用) を100  $\mu$ l / ウェルの量で室温2時間反応した。反応後、上清を除き、洗浄液 (1% FBS、0.05% Tween 20 を含む TBS) で6回各ウェルを洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (ブロッキング液で1000倍希釈) と室温2時間反応した。各ウェルを再度4回洗浄した後、各々のウェルに残存するペルオキシダーゼの酵素量を基質のTMBで検出・定量することにより、MAPと4F6との結合を調べた。各々3回行い、グラフの値は (平均値  $\pm$  SD) で表示した。

図3に示すように、4F6は量依存的にGD3模倣ペプチド3および4と結合した。見かけ上、GD3との結合は0.8  $\mu$ g / ウェル以降下がっているが、恐らくこれは、ELISAプレート上に固相化したGD3の量が多すぎ、疎水的な性質が強く働いたために、抗体との結合ができなかったものと推測される。

(3) 図3の結合親和性をさらに別の方法で検討した。96穴プレートに図4の横軸に記した量のMAPを固相化し、4F6 (100  $\mu$ l / ウェル) と一晩4℃で反応させた。翌日上清 (80  $\mu$ l) を取りだし、GD3 (100 ng / ウェル) を固相化した別のプレートに加え、室温2時間反応させた。反応後、上記(2)の方法にしたがって、GD3に結合した (MAPに吸収されなかった) 抗体4F6の量を検出定量することで、MAPによるGD3-4F6の結合阻害試験を試みた。各々3回行い、グラフの値は、(平均値  $\pm$  SD) で表示した。

その結果、図4に示すように、GD3模倣ペプチド3および4はGD3同様、

固相化した量依存的に、GD3と抗体の結合を阻止することが明らかとなった。

(4) GD3R3またはGD3R4と4F6との結合が4F6のGD3結合部位に結合しているかどうかを調べた。GD3 (100 ng/ウェル) を固相化したプレートに4F6 (100  $\mu$ l/ウェル) と同時に図5の横軸に示した種々の濃度のMAPを加え、阻害実験を行った。各々3回行い、グラフの値は(平均値 $\pm$ SD)を表示した。

その結果、図5に示すように、今回使用した濃度内では、GD3R3がGD3と同様に結合阻害を示していたが、R4は阻害効果を示さなかった。この結果から、2つのことが推測される。一つは4F6と個々のMAPとの結合の強さはGD3>GD3R3>GD3R4であること、もうひとつは、GD3R3は4F6のGD3結合部位またはその近傍に結合しているということである。

(5) 上記により、GD3R3が最も4F6のGD3結合ドメインまたは近い位置に結合していることが示された。次に、GD3模倣ペプチドにおける抗GD3抗体(4F6)との結合に必要なドメインを決定する目的で、図2に示すように、GD3R3ペプチドをN端、C端それぞれ9残基ずつのMAPを合成し、それぞれの4F6との結合をELISAで調べた。各々3回行い、グラフの値は(平均値 $\pm$ SD)で表示した。

その結果、図6に示すように、GD3R3C9が15残基とほぼ同等にGD3と4F6との結合阻害を、固相化した量依存的に引き起こしていることが判明した。

以上の結果から、GD3R3が最も強く抗GD3抗体4F6と結合しており、またC端から9残基(GD3R3C9)が結合に重要であることが示唆された。

#### 実施例6 (融合ペプチドによる免疫)

##### (1) 免疫:

実施例3(4)で得たGD3R-4とKLHとの融合ペプチド(R4-KLH)またはMAP形態であるGD3R-4とKLHとの融合ペプチド



(R4MAP-KLH)を用い、上記(1)に従い免疫した。

即ち、アジュバントと混合した(1:1、容量比)エマルジョンを、1群3匹のマウス(CD-1)のそれぞれに、上記エマルジョンの100 $\mu$ l/匹(ペプチド量30 $\mu$ g/一匹一回、ip)を投与して免疫した。投与は、R4-KLHの場合、1週間毎に1ヶ月、次いで2週間毎に1ヶ月行い、R4MAP-KLHの場合は1週間毎に2ヶ月行った。いずれも最終免疫の4日後に採血して抗血清を調製した。

尚、R4-KLHでの免疫と同様にして、GD3(30 $\mu$ g)で免疫した抗血清も調製した。

## (2) ELISA試験

GD3又はGD3R-4ペプチドを固相化したELISAプレートを用いて前記実施例4(2)に準じて試験した。

GD3固相化プレート:GD3の0.5 $\mu$ g/50 $\mu$ lメタノール-PBS溶液(1:1)を各ウェルに加え、プレートを1時間放置した。PBSで洗浄後、1%HSAのPBS溶液を200 $\mu$ l/ウェル加えて37℃2時間インキュベートしてブロッキングした。

GD3R-4ペプチド固相化プレート:0.1M重炭酸塩緩衝液(pH9.5)に溶解したGD3R-4ペプチドの1 $\mu$ gを各ウェルに加え、37℃一晩インキュベートした。PBSで洗浄後、上記同様にしてブロッキングした。

前記で得た抗血清をPBSで希釈して100~10000倍の希釈血清を調製した。この希釈血清の50 $\mu$ lを各ウェルを加えて1時間反応した。次いで、ビオチン化抗マウスイムノグロブリン抗体(Ig、IgM、IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b又はIgG3特異抗体)と1時間、更にストレプトアビジン-HRPと1時間、同様に反応させ、各ウェルの酵素活性を同様にして検出した(405nm)。

## (3) 細胞応答試験

前記の免疫マウスの脾臓を無菌下に調製し、10% FCS加RPMI 1640培地中で細切した。ナイロンウールカラムにてT細胞富化リンパ球を調製して細胞をカウントした。10<sup>5</sup>細胞/150  $\mu$ l 上記培地を培養プレートの各ウエルに加え、PHAを終濃度1  $\mu$ g/mlとなるように添加した。本発明ペプチド又は各種ガングリオシドのPBS溶液を加えて96時間インキュベーションし、各ウエルの遠心上清100  $\mu$ lを得た。上清中のIL-2活性をIL-2依存性マウス細胞CTL2を用いて測定した。即ち、培地で2~50倍希釈した上清の100  $\mu$ lを10<sup>4</sup>CTL2細胞/ウエルに加え、37℃で48時間インキュベーション後、0.5  $\mu$ Ciの3H-チミジンを上清に各ウエルに加えて6時間インキュベーションした。CTL2細胞をペーパーフィルターに回収し、標識量(3H)をカウントした。

#### (4) 結果

R4-KLHおよびR4MAP-KLHのいずれで免疫した抗血清も、GD3R-4ペプチド及びGD3の両者と反応する特異抗体を有しており、そのIgG抗体とIgM抗体の力価は略同等であった。R4-KLHで免疫した抗血清とGD3との反応性の結果を図7に示す。R4MAP-KLHで免疫した抗血清とGD3との反応性および同GD3R-4ペプチドとの反応性を図8および9に示す。

GD3免疫マウスのT細胞富化リンパ球は、ガングリオシド存在下では、IL-2活性が検出されず活性化されていると認められない(表6)。しかしながら、GD3R-4ペプチド又はGD3R-3ペプチドの存在下ではIL-2の産生が認められた(表6)。またR4-KLHで免疫されたマウスにおいても、GD3R-4ペプチドまたはGD3R-3ペプチドによるT細胞活性化が確認されている(表7)。これらの結果は、本発明ペプチドが、GD3免疫マウスにおいて特異的T細胞の活性化を引き起こすことを示唆する。

表6：種々のガングリオシド又はペプチド存在下で、GD3で免疫し、PHAで96時間刺激したマウスの脾臓細胞の培養上清中でインキュベーションしたIL-R依存性CTL2への3Hチミジンの取り込み

刺激(PHA1 $\mu$ g/ml+)	培養上清の希釈率			
	1/2	1/5	1/20	1/50
PHA 単独	2631 $\pm$ 248	1797 $\pm$ 169	804 $\pm$ 82	183 $\pm$ 19
GD3 (0.5 $\mu$ g/ml)	2795 $\pm$ 175	1876 $\pm$ 152	810 $\pm$ 72	207 $\pm$ 22
GD3 (1 $\mu$ g/ml)	2568 $\pm$ 235	1834 $\pm$ 169	762 $\pm$ 55	186 $\pm$ 27
GD3 (2 $\mu$ g/ml)	2453 $\pm$ 264	1901 $\pm$ 188	758 $\pm$ 61	197 $\pm$ 28
GD3 (5 $\mu$ g/ml)	2656 $\pm$ 257	1857 $\pm$ 185	794 $\pm$ 68	179 $\pm$ 23
GM3 (0.5 $\mu$ g/ml)	2567 $\pm$ 248	1897 $\pm$ 190	824 $\pm$ 81	182 $\pm$ 22
GM3 (1 $\mu$ g/ml)	2792 $\pm$ 218	1728 $\pm$ 157	833 $\pm$ 90	178 $\pm$ 24
GM3 (2 $\mu$ g/ml)	2725 $\pm$ 232	1824 $\pm$ 163	859 $\pm$ 82	181 $\pm$ 28
GM3 (5 $\mu$ g/ml)	2658 $\pm$ 247	1751 $\pm$ 183	832 $\pm$ 81	179 $\pm$ 22
GM1 (0.5 $\mu$ g/ml)	2754 $\pm$ 282	1841 $\pm$ 167	804 $\pm$ 84	182 $\pm$ 19
GM1 (1 $\mu$ g/ml)	2649 $\pm$ 255	1748 $\pm$ 181	825 $\pm$ 77	175 $\pm$ 27
GM1 (2 $\mu$ g/ml)	2842 $\pm$ 248	1697 $\pm$ 190	783 $\pm$ 81	167 $\pm$ 21
GM1 (5 $\mu$ g/ml)	2737 $\pm$ 264	1754 $\pm$ 184	756 $\pm$ 76	182 $\pm$ 26
peptide R4 (1 $\mu$ g/ml)	5867 $\pm$ 1213	3418 $\pm$ 749	1994 $\pm$ 348	881 $\pm$ 127
peptide R4 (2 $\mu$ g/ml)	12671 $\pm$ 1643	8349 $\pm$ 1014	3248 $\pm$ 613	1274 $\pm$ 156
peptide R4 (5 $\mu$ g/ml)	14237 $\pm$ 1884	11358 $\pm$ 1563	7526 $\pm$ 839	2684 $\pm$ 387
peptide R1 (1 $\mu$ g/ml)	3014 $\pm$ 671	1967 $\pm$ 276	888 $\pm$ 107	234 $\pm$ 43
peptide R1 (2 $\mu$ g/ml)	3219 $\pm$ 546	1831 $\pm$ 259	906 $\pm$ 121	246 $\pm$ 38
peptide R1 (5 $\mu$ g/ml)	3344 $\pm$ 497	1956 $\pm$ 285	942 $\pm$ 116	251 $\pm$ 44
peptide R2 (1 $\mu$ g/ml)	2957 $\pm$ 326	1784 $\pm$ 164	792 $\pm$ 88	185 $\pm$ 31
peptide R2 (2 $\mu$ g/ml)	3057 $\pm$ 321	1719 $\pm$ 184	856 $\pm$ 107	192 $\pm$ 40
peptide R2 (5 $\mu$ g/ml)	3022 $\pm$ 316	1717 $\pm$ 198	931 $\pm$ 124	203 $\pm$ 36
peptide R3 (1 $\mu$ g/ml)	4066 $\pm$ 853	2654 $\pm$ 486	1153 $\pm$ 246	571 $\pm$ 104
peptide R3 (2 $\mu$ g/ml)	5791 $\pm$ 1154	3243 $\pm$ 634	1540 $\pm$ 467	749 $\pm$ 118
peptide R3 (5 $\mu$ g/ml)	7536 $\pm$ 1247	3528 $\pm$ 543	1566 $\pm$ 328	761 $\pm$ 102

数値は平均 $\pm$ SE (4ウエル)

表7：種々のガングリオシド又はペプチド存在下で、R4ペプチドで免疫し、PHAで96時間刺激したマウスの脾臓細胞の培養上清中でインキュベーションしたIL-2依存性CTL2への3Hチミジンの取り込み

刺激 (PHA1 $\mu$ g/ml+)	培養上清の希釈率			
	1/2	1/5	1/20	1/50
PHA 単独	2732 $\pm$ 265	1628 $\pm$ 147	813 $\pm$ 96	164 $\pm$ 28
GD3 (0.5 $\mu$ g/ml)	2635 $\pm$ 308	1792 $\pm$ 154	850 $\pm$ 87	169 $\pm$ 25
GD3 (1 $\mu$ g/ml)	2721 $\pm$ 284	1658 $\pm$ 134	794 $\pm$ 82	202 $\pm$ 24
GD3 (2 $\mu$ g/ml)	2797 $\pm$ 295	1722 $\pm$ 163	809 $\pm$ 74	212 $\pm$ 28
GD3 (5 $\mu$ g/ml)	2619 $\pm$ 316	1636 $\pm$ 145	764 $\pm$ 68	184 $\pm$ 23
GM3 (0.5 $\mu$ g/ml)	2741 $\pm$ 279	1683 $\pm$ 167	812 $\pm$ 84	167 $\pm$ 21
GM3 (1 $\mu$ g/ml)	2814 $\pm$ 321	1728 $\pm$ 181	873 $\pm$ 90	194 $\pm$ 25
GM3 (2 $\mu$ g/ml)	2754 $\pm$ 286	1619 $\pm$ 155	768 $\pm$ 83	157 $\pm$ 22
GM3 (5 $\mu$ g/ml)	2631 $\pm$ 264	1587 $\pm$ 163	729 $\pm$ 89	152 $\pm$ 26
GM1 (0.5 $\mu$ g/ml)	2750 $\pm$ 317	1683 $\pm$ 178	801 $\pm$ 93	204 $\pm$ 25
GM1 (1 $\mu$ g/ml)	2812 $\pm$ 309	1715 $\pm$ 186	826 $\pm$ 75	210 $\pm$ 31
GM1 (2 $\mu$ g/ml)	2788 $\pm$ 274	1664 $\pm$ 191	837 $\pm$ 78	224 $\pm$ 29
GM1 (5 $\mu$ g/ml)	2764 $\pm$ 285	1728 $\pm$ 183	872 $\pm$ 71	219 $\pm$ 28
peptide R4 (1 $\mu$ g/ml)	6781 $\pm$ 1549	4413 $\pm$ 854	2420 $\pm$ 561	1017 $\pm$ 182
peptide R4 (2 $\mu$ g/ml)	15383 $\pm$ 2194	10375 $\pm$ 1708	7934 $\pm$ 1031	2742 $\pm$ 751
peptide R4 (5 $\mu$ g/ml)	18692 $\pm$ 2310	12657 $\pm$ 1624	8354 $\pm$ 957	3058 $\pm$ 568
peptide R1 (1 $\mu$ g/ml)	3218 $\pm$ 716	1876 $\pm$ 281	949 $\pm$ 136	225 $\pm$ 38
peptide R1 (2 $\mu$ g/ml)	3417 $\pm$ 542	1864 $\pm$ 327	845 $\pm$ 147	220 $\pm$ 40
peptide R1 (5 $\mu$ g/ml)	3469 $\pm$ 612	1781 $\pm$ 285	901 $\pm$ 152	236 $\pm$ 45
peptide R2 (1 $\mu$ g/ml)	2857 $\pm$ 493	1714 $\pm$ 239	745 $\pm$ 136	178 $\pm$ 38
peptide R2 (2 $\mu$ g/ml)	2764 $\pm$ 322	1653 $\pm$ 286	694 $\pm$ 141	163 $\pm$ 41
peptide R2 (5 $\mu$ g/ml)	2849 $\pm$ 396	1628 $\pm$ 245	748 $\pm$ 162	174 $\pm$ 32
peptide R3 (1 $\mu$ g/ml)	5577 $\pm$ 1063	2986 $\pm$ 327	1491 $\pm$ 364	682 $\pm$ 120
peptide R3 (2 $\mu$ g/ml)	6351 $\pm$ 1314	3184 $\pm$ 439	1527 $\pm$ 337	736 $\pm$ 137
peptide R3 (5 $\mu$ g/ml)	7898 $\pm$ 1496	3652 $\pm$ 681	1684 $\pm$ 375	812 $\pm$ 151

数値は平均 $\pm$ SE (4ウエル)

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、癌組織または癌細胞表面上に発現するGD3を模倣する新規なアミノ酸配列が提供され、当該アミノ酸配列からなる本発明GD3模倣ペプチドは、例えば癌の診断剤や癌ワクチン等の医薬に応用可能であり、かくして、癌治療効果の向上に寄与する癌治療方法および癌診断方法等が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1から4のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加もしくは挿入により改変されたアミノ酸配列を含むペプチドであって、抗GD3抗体に特異的な結合性を有するペプチドからなるGD3模倣ペプチド。
2. 免疫原性を高めるキャリア蛋白との融合ペプチド形態である請求項1記載のGD3模倣ペプチド。
3. キャリア蛋白がキーホールリンペットヘモシアニンである請求項2記載のGD3模倣融合ペプチド。
4. 少なくとも1種のGD3模倣ペプチドを含む多抗原性ペプチド形態である請求項1記載のGD3模倣ペプチド。
5. GD3に特異的な抗体の産生能を有する免疫原性ペプチドである請求項1記載のGD3模倣ペプチド。
6. 配列番号：1から4のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項1記載のGD3模倣ペプチド。
7. 請求項1記載のGD3模倣ペプチドを有効成分として含有する医薬組成物。

図 1

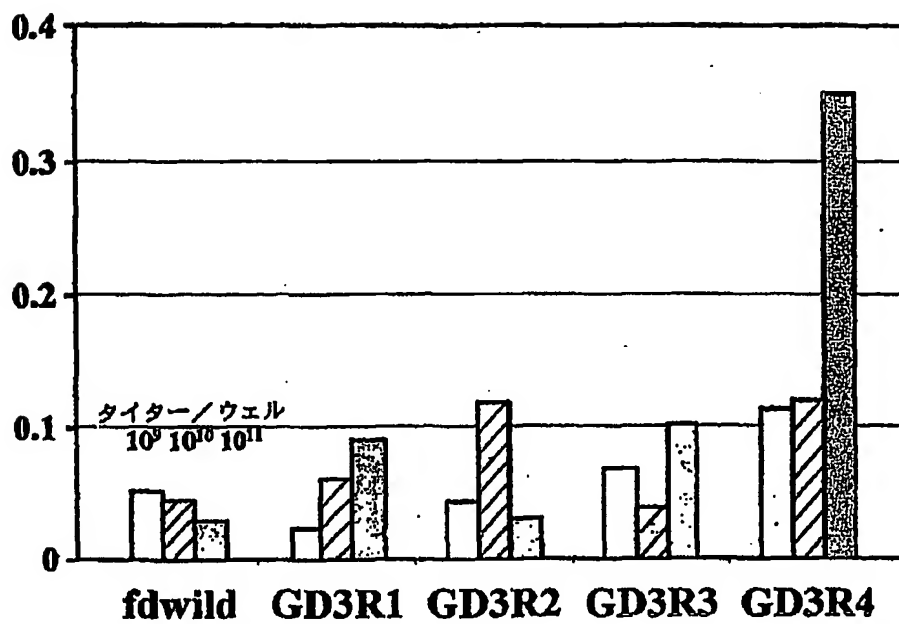


図 2.

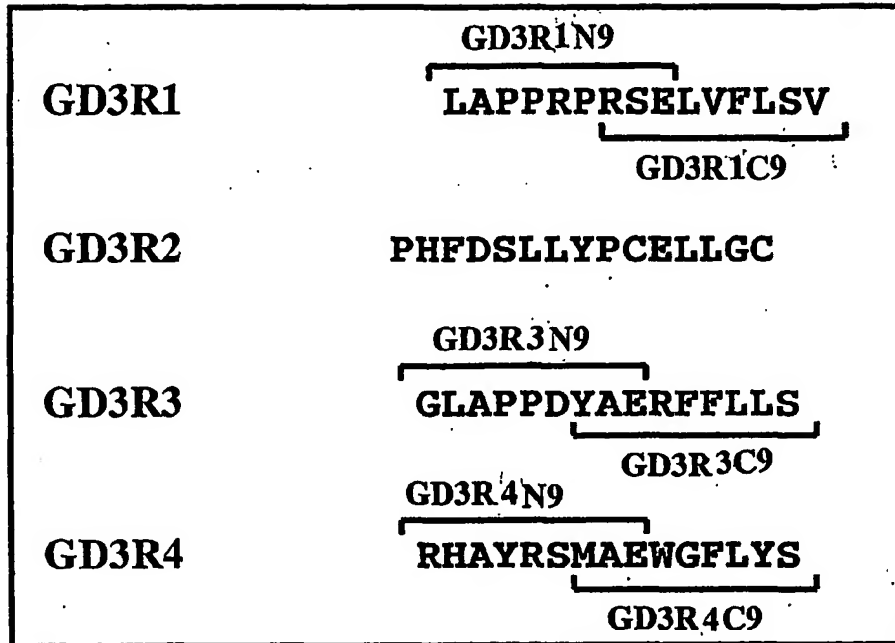


図 3

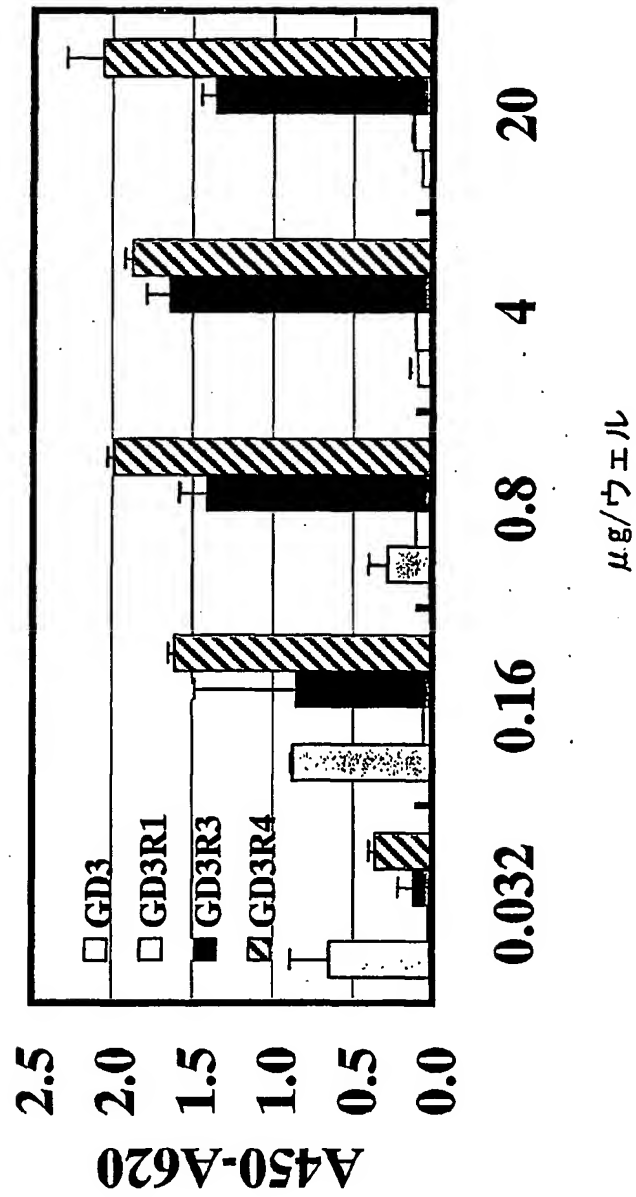




図 4

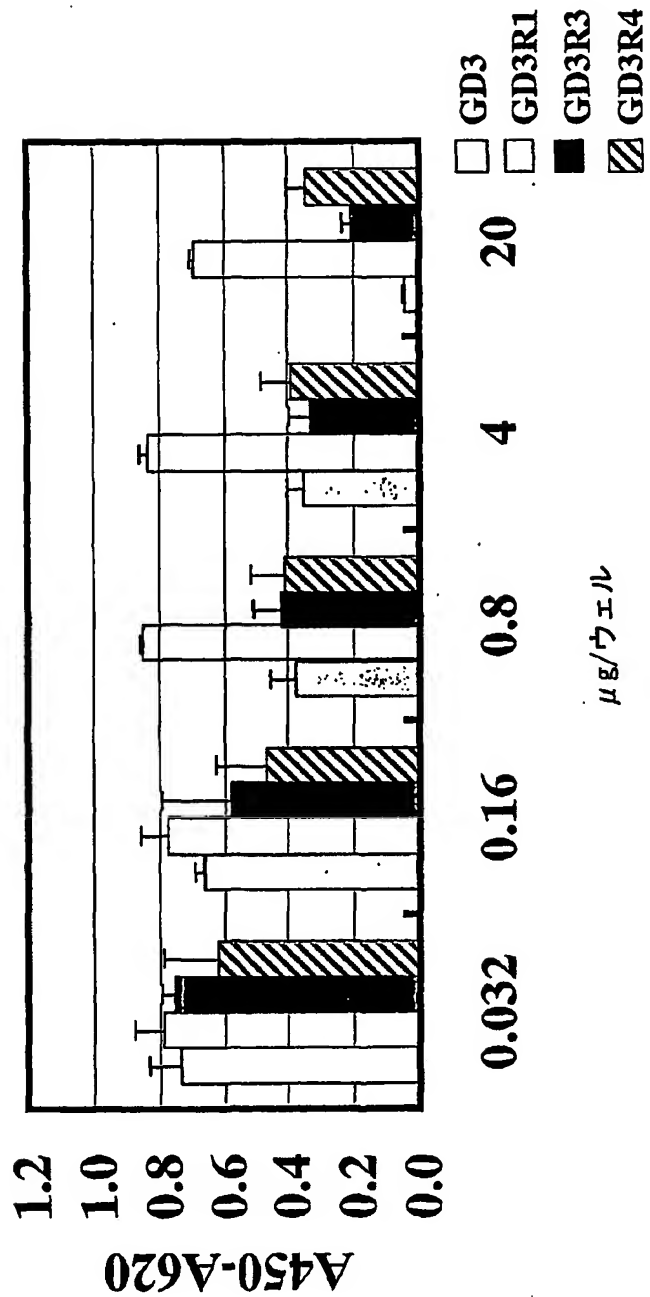


図 5

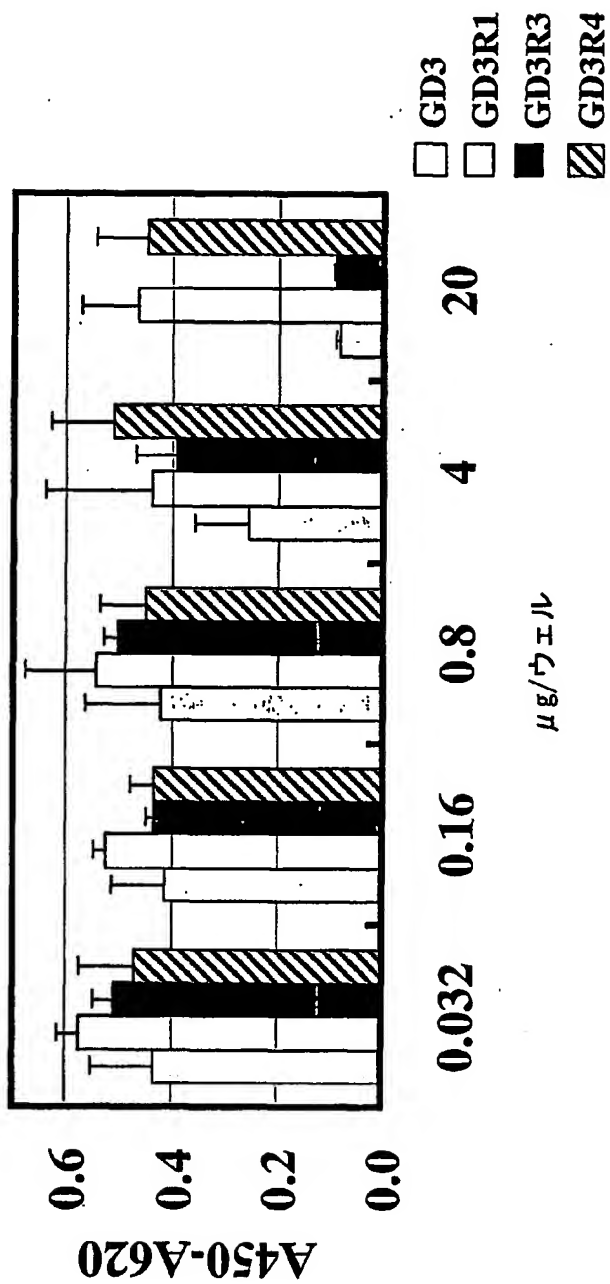


図 9

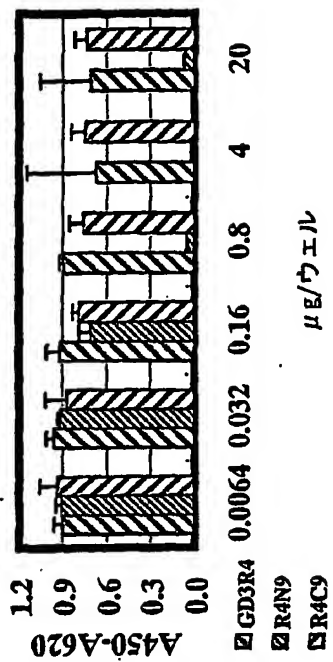
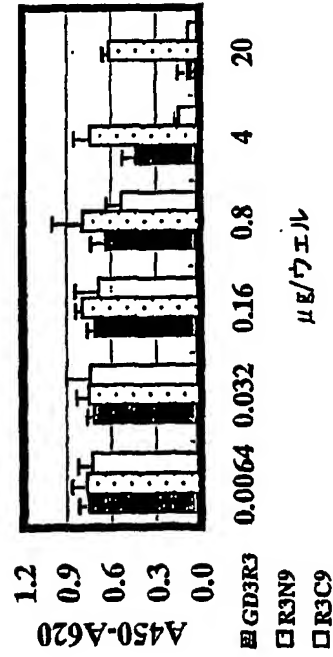
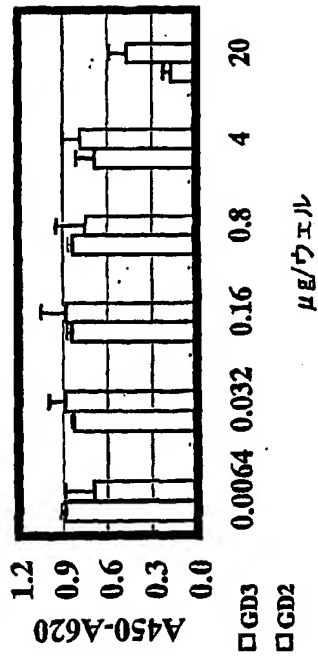


図 7

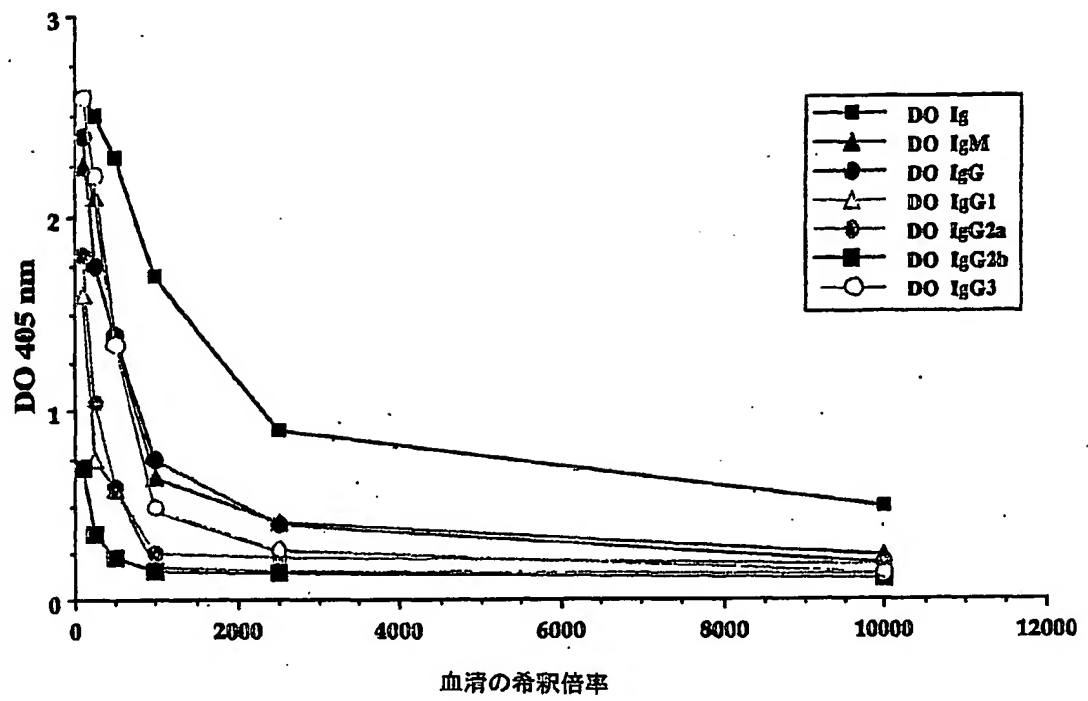


図 8

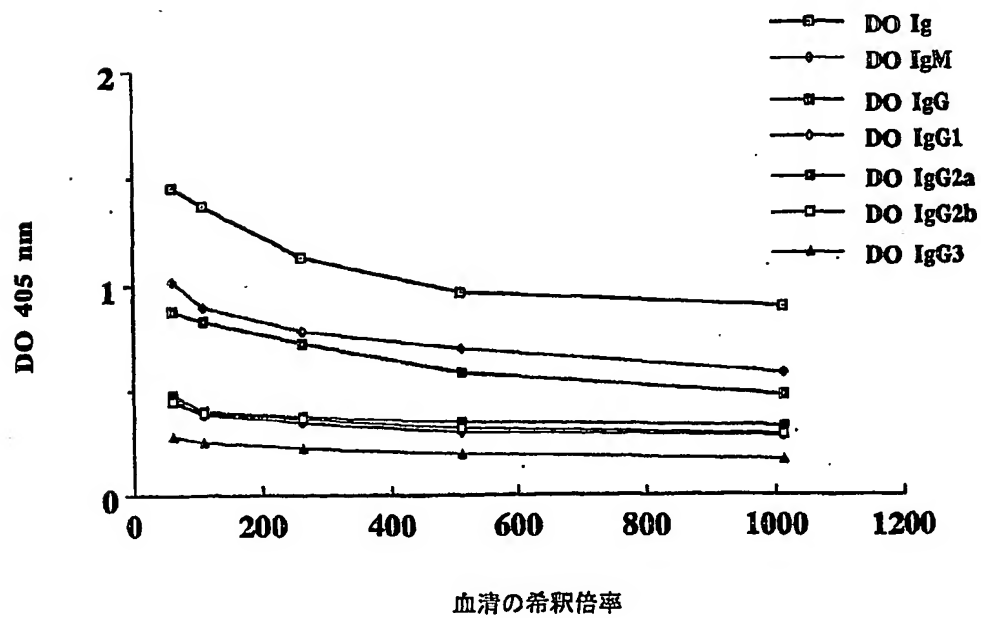
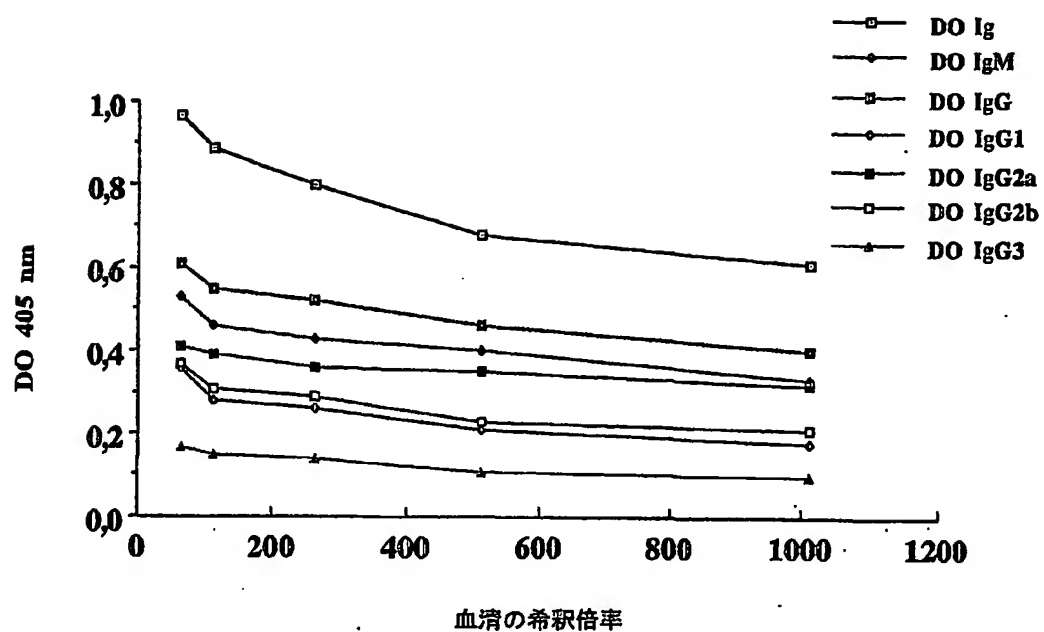


図 9



## SEQUENCE LISTING

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> GD3 mimic peptide

<130> OP0035

<150> JP P2000-124259

<151> 2000-04-25

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Pharge display library(GD3R-1)

<400> 1

Leu Ala Pro Pro Arg Pro Arg Ser Glu Leu Val Phe Leu Ser Val

1

5

10

15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Pharge display library(GD3R-2)

<400> 2

Pro His Phe Asp Ser Leu Leu Tyr Pro Cys Glu Leu Leu Gly Cys

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Pharge display library(GD3R-3)

<400> 3

Gly Leu Ala Pro Pro Asp Tyr Ala Glu Arg Phe Phe Leu Leu Ser

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Pharge display library(GD3R-4)

<400> 4

Arg His Ala Tyr Arg Ser Met Ala Glu Trp Gly Phe Leu Tyr Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> Phage display library (GD3R-1)

<400> 5

ctggctcttc ctcgccgcg ttctgagctg gttttcttt ctgtt

45

<210> 6

<211> 45

<212> DNA

<213> Phage display library (GD3R-2)

<400> 6

ccgcattttg attcgttgct gtaiccttgt gagctgctgg ggtgt

45

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Phage display library (GD3R-3)

<400> 7

ggtcttgctc cgccggatta tgcigagcgt tttttcttc ttctt

45

<210> 8

<211> 45

<212> DNA



<213> Pharge display library(GD3R-4)

<400> 8

cggcatgcct atcggtctat ggctgagtgg gggtttctgt attct

45

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer sequence

<400> 9

taacactgag ttctgtcacc agta

24

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Pharge display library

<400> 10

Ala Asp Gly Ala Arg Gly Gly Phe Ser Asp Thr Ser Arg Thr Gly Met

1

5

10

15

Val Ser Val Gly Ala Ala Gly

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03443

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/08, 14/47, 19/00, C12N15/00, A61K38/10, 39/00, A61P35/00, 35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/08, 14/47, 19/00, C12N15/00, A61K38/10, 39/00, A61P35/00, 35/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBJ/PIR/SwissProt/Genseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jianping Qiu et al., "Towards the Development of Peptide Mimotopes of Carbohydrate Antigens as Cancer Vaccines" Hybridoma, Vol.18(1), pp.103-112 (1999)	1-7
A	Soo Kie Kim et al., "Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH", Vaccine, 2000, Vol.18, pp.597-603 Hybridoma(1) (1999)	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July, 2001 (17.07.01)

Date of mailing of the international search report

24 July, 2001 (24.07.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K7/08, 14/47, 19/00, C12N15/00, A61K38/10, 39/00, A61P35/00, 35/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K7/08, 14/47, 19/00, C12N15/00, A61K38/10, 39/00, A61P35/00, 35/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt/Genseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Jianping Qiu et al., Towards the Development of Peptide Mimotopes of Carbohydrate Antigens as Cancer Vaccines, Hybridoma, 1999, Vol. 18(1), p. 103-112	1-7
A	Soo Kie Kim et al., Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH, Vaccine, 2000, Vol. 18, p. 597-603	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 07. 01

国際調査報告の発送日

24.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3448